



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha

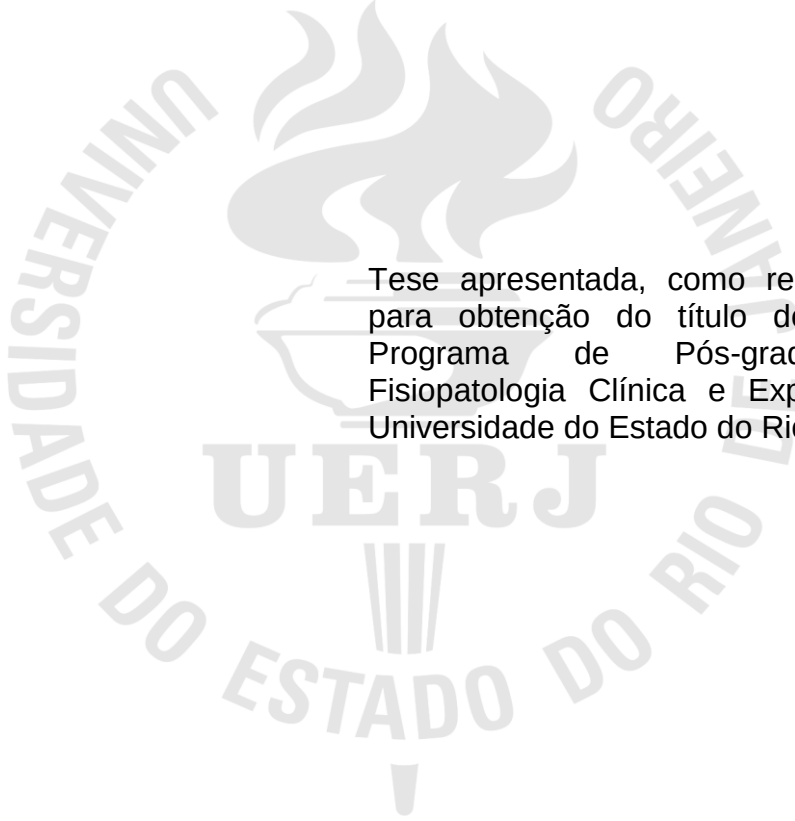
**Influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de  
insulina *in vitro* em camundongos *Swiss* adultos  
hiperalimentados na lactação**

Rio de Janeiro

2012

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha

**Influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em camundongos Swiss adultos hiperalimentados na lactação**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C972 Cunha, Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues.  
Influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em camundongos *Swiss* adultos hiperalimentados na lactação / Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha. – 2012.  
121 f.

Orientador: Aníbal Sanches Moura.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Insulina – Secreção – Teses. 2. Grelina – Teses. 3. Hipernutrição - Teses. I. Moura, Aníbal Sanches Moura. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-008.9

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Alessandra Cordeiro de Souza Rodrigues Cunha

Tese apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor, ao  
Programa de Pós-graduação em  
Fisiopatologia Clínica e Experimental

Aprovada em 25 de Janeiro de 2012.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Isis Hara Trevenzoli  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Luís Carlos Reis  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cristina Lisboa da Silva  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Paulinho, pela força, cuidado, alegria e por fazer do nosso lar um ambiente de paz. Te amo pra sempre!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo direcionamento até aqui.

A minha família: Meus pais Sônia e Alcir, “Dona” Elfa, minha irmã Lili e meu cunhado Ezau. Obrigada pelo apoio e compreensão.

Ao meu esposo Paulinho e ao meu sobrinho Pedro por fazerem meu sorriso brotar em meio às preocupações e às crianças as quais me dedico pela partilha dos “sonhos” e lindos desenhos.

Ao professor Dr. Anibal Sanches Moura, sou grata pela inserção ao meio científico quando eu ainda cursava o 2º período da graduação em Nutrição nesta universidade. Agradeço a orientação, apoio e ricos ensinamentos ao longo de todos estes anos!

A professora Dr<sup>a</sup>. Érica Patrícia Garcia Souza por compartilhar seu conhecimento e pelos momentos de descontração e às professoras Dr<sup>a</sup>. Érica Afonso Costa Cortez Marques e Dr<sup>a</sup>. Alessandra Alves Thole que surgiram em tempo oportuno em minha vida profissional, trazendo consigo além de talento, generosidade.

Ao professor Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias, ao bioterista Nelcir Rodrigues de Moraes e ao Dr. Mário José dos Santos Pereira. Obrigada por compartilharem parte de seu tempo e conhecimentos.

Ao Laboratório de Cultura de células pela colaboração em meus experimentos. Também agradeço a todos os mestrandos (as), doutorandos (as) e alunos (as) de iniciação científica dos Departamentos de Fisiologia Humana, Farmacologia e Histologia e Embriologia que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste estudo.

À Ana, Faby e Anátalia por tornarem minha rotina mais “leve”. “Em todo tempo ama o amigo; e na angústia nasce o irmão” (Pv 17.17).

À Rejane Pontes minha admiração: Você é exemplo de determinação.

À banca examinadora, especialmente a professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva que também aceitou revisar esta tese.

Ao instituto Vital Brasil, aos órgãos de apoio financeiro à pesquisa: CAPES, CNPQ e FAPERJ e aos coordenadores do FISCLINEX pela indicação à “Bolsa Nota 10”.

Aprender não é um ato findo. Aprender é um exercício constante de renovação.

*Paulo Freire*

## RESUMO

CORDEIRO, Alessandra. *Influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de insulina in vitro em camundongos Swiss adultos hiperalimentados na lactação*. 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O excesso ou a privação de nutrientes em períodos específicos do desenvolvimento, tais como a lactação, estimulam alterações no metabolismo celular, por exemplo. Estas modificações perpetuam-se ao longo da vida e em consequência tornam o organismo mais suscetível ao aparecimento de patologias na idade adulta (Programação Metabólica). Estudamos a influência da grelina na secreção de insulina em camundongos *Swiss* de 120 dias submetidos à hiperalimentação na lactação. Para induzir a hiperalimentação as ninhadas foram reduzidas a 3 filhotes machos por lactante no 3<sup>o</sup> dia de vida pós-natal. As ninhadas controle foram ajustadas para 9 filhotes machos por lactante. Na idade adulta os animais hiperalimentados (AH) exibiram em comparação aos animais controle (AC) um incremento de 20% no peso corporal, maior índice de Lee (1705,63 g/mm  $\pm$  29,3 vs 1374,10 g/mm  $\pm$  54,9;  $p < 0,001$ ), elevação da gordura corporal (31,0%  $\pm$  4,6 vs 21,5%  $\pm$  3,6;  $p < 0,01$ ), aumento da gordura retroperitoneal (0,79 g  $\pm$  0,1 vs 0,44 g  $\pm$  0,1;  $p < 0,001$ ), hiperglicemia de jejum (151,83 mg/ dl  $\pm$  8,3 vs 118,0 mg/ dl  $\pm$  1,0;  $p < 0,001$ ), hiperinsulinemia de jejum (54,06  $\mu$ UI/ml  $\pm$  2,3 vs 19,28  $\mu$ UI/ml  $\pm$  1,53;  $p < 0,001$ ) e hipogrelinemia de jejum (98,64 pg/ml  $\pm$  56,5 vs 201,14 pg/ml  $\pm$  46,4;  $p < 0,05$ ). Os AH apresentaram maior secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose aos 10 minutos (209,66  $\mu$ UI/ml  $\pm$  46,5;  $p < 0,05$ ), 30 minutos (441,88  $\mu$ UI/ml  $\pm$  30,2;  $p < 0,05$ ) e 60 minutos (214,34  $\mu$ UI/ml  $\pm$  29,8) em comparação aos AC, respectivamente 86,90  $\mu$ UI/ml  $\pm$  9,5; 74,31  $\mu$ UI/ml  $\pm$  7,7 vs 27,45  $\mu$ UI/ml  $\pm$  6,1;  $p < 0,05$ . As ilhotas pancreáticas dos AH adultos demonstraram em relação aos AC diminuição do consumo de O<sub>2</sub> (1,76 pmols O<sub>2</sub>/ s. ilhota<sup>-1</sup>  $\pm$  0,4 vs 4,85 pmols O<sub>2</sub>/ s. ilhota<sup>-1</sup>  $\pm$  1,5;  $p < 0,001$ ) e elevação do conteúdo do receptor de grelina GHSR1A (3,05 %  $\pm$  2,13 vs 0,95 %  $\pm$  0,1;  $p < 0,05$ ). A grelina acilada estimulou a secreção de insulina *in vitro* dos AC aos 30 minutos (controle com grelina: 208,50  $\mu$ UI/ml  $\pm$  40,85 vs controle sem grelina: 74,31  $\mu$ UI/ml  $\pm$  7,7;  $p < 0,05$ ) e diminuiu a razão do controle respiratório (controle com grelina: 1,45  $\pm$  0,2 vs controle sem grelina: 2,51  $\pm$  0,7;  $p < 0,05$ ). Nos AH, a grelina acilada elevou o conteúdo de GLUT2 nas ilhotas pancreáticas em relação aos AC (hiperalimentados com grelina: 2,07 %  $\pm$  0,5 vs controle com grelina: 0,85 %  $\pm$  0,4;  $p < 0,01$ ); entretanto a grelina não foi capaz de estimular a secreção de insulina nestes animais. Concluímos que a hiperalimentação na lactação associou-se ao aumento da gordura corporal e elevou a secreção de insulina na fase tardia do desenvolvimento. A grelina acilada estimulou a secreção de insulina somente nos AC adultos.

Palavras chave: Hipernutrição. Insulina. Grelina. Camundongos.



## ABSTRACT

Excess or lack of nutrients at specific times of development generates adaptive responses that can change the body causing the onset of chronic diseases in adulthood (Metabolic Programming). We studied the influence of the hormone ghrelin in insulin secretion of adult Swiss mice overfed during lactation. To induce early postnatal overnutrition, the litter size was reduced to 3 pups per litter at the 3<sup>rd</sup> day after birth. In the control group, the litter size was adjusted to 9 pups per litter. In adulthood, overfed group (OG) had an increase of 20% in body weight compared to control group (CG). OG had increased in Lee index ( $1705.63 \text{ g/mm} \pm 29.3$  vs  $1374.10 \text{ g/mm} \pm 54.9$ ;  $p < 0.001$ ), high body fat ( $31.0\% \pm 4.6$  vs  $21.5\% \pm 3.6$ ;  $p < 0.01$ ), and an elevated retroperitoneal fat ( $0.79 \text{ g} \pm 0.1$  vs  $0.44 \text{ g} \pm 0.1$ ;  $p < 0.001$ ), fasting hyperglycemia ( $151.83 \text{ mg/dl} \pm 8.3$  vs  $118.0 \text{ mg/dl} \pm 1.0$ ;  $p < 0.001$ ), high fasting insulinemia ( $54.06 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 2.3$  vs  $19.28 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 1.53$ ;  $p < 0.001$ ), and low fasting plasma ghrelin ( $98.64 \text{ pg/ml} \pm 56.5$  vs  $201.14 \text{ pg/ml} \pm 46.4$ ;  $p < 0.05$ ) compared to CG at 120 days. OG exhibited high insulin secretion in vitro at 10 minutes ( $209.66 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 46.5$ ), 30 minutes ( $441.88 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 30.2$ ), and 60 minutes ( $214.34 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 29.8$ ) compared to CG, respectively  $86.90 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 9.5$ ;  $74.31 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 7.7$  vs  $27.45 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 6.1$ ;  $p < 0.05$ . Pancreatic islets from OG had a decrease of  $\text{O}_2$  consumption compared to CG ( $1.76 \text{ pmols } \text{O}_2/\text{s. islets}^{-1} \pm 0.4$  vs  $4.85 \text{ pmols } \text{O}_2/\text{s. islets}^{-1} \pm 1.5$ ;  $p < 0.001$ ) and an increased of GHSR1A content ( $3.05\% \pm 2.13$  vs  $0.95\% \pm 0.1$ ;  $p < 0.05$ ). Acylated ghrelin increased control group's insulin secretion in vitro at 30 minutes (CG with ghrelin:  $208.50 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 40.85$  vs CG without ghrelin  $74.31 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 7.7$ ;  $p < 0.05$ ) and decreased the respiratory control ratio (CG with ghrelin:  $1.45 \pm 0.2$  vs CG without ghrelin:  $2.51 \pm 0.7$ ;  $p < 0.05$ ). Also acylated ghrelin increased the GLUT2 content of pancreatic islets from OG compared to CG, respectively  $2.07\% \pm 0.5$  vs  $0.85\% \pm 0.4$ ;  $p < 0.01$ ; however acylated ghrelin was not able to stimulate insulin secretion in OG. We conclude that the overnutrition during lactation is associated with increased body fat percentage and changes in pancreatic  $\beta$  cells in the late stage of development. Acylated ghrelin stimulated insulin secretion only in adult CG.

Key words: Overfeeding. Insulin. Ghrelin. Mice.

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                         |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 1–  | Processo de estímulo-secreção de insulina na célula $\beta$ pancreática.....                                            |
| Figura 2–  | Secreção bifásica da insulina.....                                                                                      |
| Figura 3–  | Autoregulação da célula $\beta$ pancreática pela insulina.....                                                          |
| Figura 4–  | Esquema de organização dos animais hiperalimentados e controle.                                                         |
| Figura 5–  | Esquema de incubação das ilhotas pancreáticas para estudo da secreção de insulina <i>in vitro</i> .....                 |
| Figura 6–  | Curva de ganho de peso corporal.....                                                                                    |
| Figura 7–  | Distância naso-anal.....                                                                                                |
| Figura 8–  | Índice de Lee.....                                                                                                      |
| Figura 9–  | Massa coporal livre de gordura.....                                                                                     |
| Figura 10– | Gordura corporal total.....                                                                                             |
| Figura 11– | Gordura retroperitoneal.....                                                                                            |
| Figura 12– | Glicemia de jejum.....                                                                                                  |
| Figura 13– | Insulinemia de jejum.....                                                                                               |
| Figura 14– | Grelinemia de jejum.....                                                                                                |
| Figura 15– | Secreção de insulina in vitro dos camundongos controle.....                                                             |
| Figura 16– | Conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle.....                                       |
| Figura 17– | Área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle..... |
| Figura 18– | Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle.....                                        |
| Figura 19– | Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle.....                                        |
| Figura 20– | Conteúdo de PAKT/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle.....                                         |

|            |                                                                                                                                                               |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 21– | Secreção de insulina <i>in vitro</i> dos camundongos hiperalimentados e controle.....                                                                         |
| Figura 22– | Conteúdo de GRSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle.....                                                              |
| Figura 23– | Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle.....                                                               |
| Figura 24– | Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle.....                                                               |
| Figura 25– | Secreção de insulina <i>in vitro</i> dos camundongos hiperalimentados e controle em presença de grelina.....                                                  |
| Figura 26– | Conteúdo de GRSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina.....                                       |
| Figura 27– | Área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina..... |
| Figura 28– | Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina.....                                        |
| Figura 29– | Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina.....                                        |
| Figura 30– | Consumo de O <sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas em presença de glicose oligomicina.....                                                                    |
| Figura 31– | Conteúdo de UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle.....                                                                |
| Figura 32– | Consumo de O <sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas em presença de glicose, grelina e oligomicina.....                                                         |
| Figura 33– | Razão do controle respiratório das ilhotas pancreáticas (RCR).....                                                                                            |
| Figura 34– | Conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina.....                                         |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |                                                                                                                               |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| µg –                | Micrograma                                                                                                                    |
| µl –                | Microlitro                                                                                                                    |
| µUI –               | Microunidade internacional                                                                                                    |
| ACC –               | Acil-CoA Carboxilase                                                                                                          |
| AGL –               | Ácidos Graxos Livres                                                                                                          |
| AgRP –              | Peptídeo Relacionado à Agouti                                                                                                 |
| AKT –               | Proteína quinase B                                                                                                            |
| AMPK –              | <i>AMP-activated protein Kinase</i> (Proteína kinase ativada por AMP)                                                         |
| ATP –               | Adenosina trifosfato                                                                                                          |
| C –                 | Celsius                                                                                                                       |
| CoA –               | Coenzima A                                                                                                                    |
| dl –                | Decilitro                                                                                                                     |
| FADH <sub>2</sub> – | Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzido                                                                                        |
| FAO –               | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) |
| FAS –               | Ácido Graxo Sintetase                                                                                                         |
| G –                 | Gravidade                                                                                                                     |
| GLUT2 –             | Transportador de Glicose tipo 2                                                                                               |
| GLUT4 –             | Transportador de Glicose tipo 4                                                                                               |
| GSK3 –              | Glicogênio-sintase Kinase                                                                                                     |
| HDL –               | Lipoproteína de alta densidade                                                                                                |
| IRS1 –              | Substrato do Receptor de Insulina 1                                                                                           |
| IRS2 –              | Substrato do Receptor de Insulina 2                                                                                           |
| K-Da –              | Quilodalton                                                                                                                   |
| K <sub>m</sub> –    | Constante Michaelis-Mentem                                                                                                    |

|                      |                                                                                                            |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LDL –                | Lipoproteína de baixa densidade                                                                            |
| LPL –                | Lipase lipoprotéica                                                                                        |
| mA –                 | Miliamper                                                                                                  |
| mM –                 | Milimolar                                                                                                  |
| mmol –               | Milimol                                                                                                    |
| mTOR –               | <i>malian Target of Rapamicyn</i> (Alvo Mamífero de Rampamicina)                                           |
| NADHH <sup>+</sup> – | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido                                                                |
| NC –                 | Ninhada controle                                                                                           |
| nm –                 | Nanômetro                                                                                                  |
| NPY –                | Neuropeptídio Y                                                                                            |
| NR –                 | Ninhada reduzida                                                                                           |
| pH –                 | Potencial hidrogeniônico                                                                                   |
| PI3K –               | Fosfoinositídio 3-quinase                                                                                  |
| PKA –                | Proteína Quinase A                                                                                         |
| POMC –               | Pró-Ópiomelanocortina                                                                                      |
| RPM –                | Rotação por minuto                                                                                         |
| SREBP –              | <i>Sterol Regulatory element-binding proteins</i> (Proteínas ligadoras do Elemento Regulatório de Esterol) |
| UCP2 –               | <i>Uncoupling protein-2</i> (Proteína desacopladora tipo 2)<br>Glicogênio-sintase Kinase                   |
| GSK3 –               | Lipoproteína de alta densidade                                                                             |
| VLDL –               | Lipoproteína de muito baixa densidade<br>Substrato do Receptor de Insulina 2                               |
| V <sub>máx</sub> –   | Velocidade máxima                                                                                          |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                           |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|          | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                    | <b>15</b> |
| <b>1</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                         | <b>XX</b> |
| 1.1      | Obesidade e diabetes mellitus tipo 2: Doenças do adulto com procedência na infância.....                  |           |
| 1.2      | Insulina: Processo de estímulo-secreção, ações periféricas e relação com a obesidade.....                 |           |
| 1.3      | Grelina: Influência no consumo de alimentos, homeostase glicêmica e secreção de insulina.....             |           |
| 1.4      | Modelo de hiperalimentação através da redução da ninhada.....                                             |           |
| <b>2</b> | <b>HIPÓTESE.....</b>                                                                                      |           |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                     |           |
| 3.1      | Objetivo geral.....                                                                                       |           |
| 3.2      | Objetivos específicos propostos para os animais hiperalimentados e seus respectivos animais controle..... |           |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                            |           |
| 4.1      | Modelo de hiperalimentação através da redução de ninhada.....                                             |           |
| 4.2      | Ganho de peso corporal.....                                                                               |           |
| 4.3      | Crescimento naso-anal.....                                                                                |           |
| 4.4      | Índice de Lee.....                                                                                        |           |
| 4.5      | Peso da gordura retroperitoneal.....                                                                      |           |
| 4.6      | Avaliação da composição corporal.....                                                                     |           |
| 4.7      | Identificação da glicemia.....                                                                            |           |
| 4.8      | Dosagem da grelina plasmática.....                                                                        |           |
| 4.9      | Dosagem da insulina plasmática.....                                                                       |           |
| 4.10     | Isolamento das ilhotas pancreáticas e secreção de insulina <i>in vitro</i> .....                          |           |
| 4.11     | Conteúdo de GHSR1A, GLUT2, PAKT, PAMPK e UCP2.....                                                        |           |
| 4.12     | Análise do consumo de oxigênio pelas ilhotas pancreáticas (Respirometria de alta resolução) .....         |           |
| 4.13     | Análise estatística.....                                                                                  |           |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                    |           |
| 5.1      | Seção I: Biometria, glicemia e dosagem hormonal dos animais                                               |           |

|       |                                                                                                                                                                                         |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | <b>controle e hiperalimentados.....</b>                                                                                                                                                 |
| 5.1.1 | <u>Curva de ganho de peso corporal dos animais hiperalimentados e controle..</u>                                                                                                        |
| 5.1.2 | <u>Distância naso-anal e índice de Lee dos animais hiperalimentados e controle.....</u>                                                                                                 |
| 5.1.3 | <u>Proteína corporal e gordura corporal total dos animais hiperalimentados e controle.....</u>                                                                                          |
| 5.1.4 | <u>Gordura retroperitoneal dos animais hiperalimentados e controle.....</u>                                                                                                             |
| 5.1.5 | <u>Glicemia e insulinemia de jejum dos animais hiperalimentados e controle....</u>                                                                                                      |
| 5.1.6 | <u>Grelinemia de jejum dos animais hiperalimentados e controle.....</u>                                                                                                                 |
| 5.2   | <b>Seção II: Secreção de insulina <i>in vitro</i> e conteúdo de proteínas específicas nas ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</b>        |
| 5.2.1 | <u>Secreção de insulina <i>in vitro</i> dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                               |
| 5.2.2 | <u>Conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                |
| 5.2.3 | <u>Área sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                |
| 5.2.4 | <u>Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                 |
| 5.2.5 | <u>Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                 |
| 5.2.6 | <u>Conteúdo de PAKT/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                  |
| 5.3   | <b>Seção III: Secreção de insulina <i>in vitro</i> e conteúdo de proteínas específicas nas ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose.....</b> |
| 5.3.1 | <u>Secreção de insulina <i>in vitro</i> dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose.....</u>                                                                         |
| 5.3.2 | <u>Conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose.....</u>                                                          |
| 5.3.3 | <u>Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose.....</u>                                                           |

|       |                                                                                                                                                                                                     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.3.4 | <u>Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose.....</u>                                                                       |
| 5.4   | <b>Seção IV: Secreção de insulina <i>in vitro</i> e conteúdo de proteínas específicas nas ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose mais grelina.....</b> |
| 5.4.1 | <u>Secreção de insulina <i>in vitro</i> dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                        |
| 5.4.2 | <u>Conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                         |
| 5.4.3 | <u>Área sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados em presença de glicose mais grelina.....</u>                                    |
| 5.4.4 | <u>Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                          |
| 5.4.5 | <u>Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                                             |
| 5.5   | <b>Seção V: Respirometria e conteúdo da proteína desacopladora UCP2 nas ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose e grelina.....</b>                      |
| 5.5.1 | <u>Consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose e oligomicina.....</u>                                                          |
| 5.5.2 | <u>Conteúdo de UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose.....</u>                                                                        |
| 5.5.3 | <u>Consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose, grelina e oligomicina.....</u>                                                 |
| 5.5.4 | <u>Razão do controle respiratório das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle.....</u>                                                                                         |
| 5.5.5 | <u>Conteúdo de UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina.....</u>                                                           |
| 6     | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                                               |
| 7     | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                                               |
|       | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                             |



## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o sobrepeso e a obesidade têm impressionado pelo aumento das suas prevalências em várias partes do mundo. A Organização Mundial de Saúde estima pelo menos 1 bilhão de adultos apresenta sobrepeso e 300 milhões são obesos. Em relação ao Brasil, inquéritos populacionais mostraram que o país passou por um processo de transição nutricional. Segundo MONTEIRO (1995), em 15 anos (1975 a 1989) houve uma redução na prevalência de desnutrição infantil de 19,8% para 7,6%, enquanto a obesidade aumentou de 5,7% para 9,6%.

Apesar do excesso de peso corporal estar associado a enfermidades que significam uma ameaça à qualidade e ao tempo de vida e, mesmo existindo campanhas que estimulam a alimentação saudável, as projeções existentes sugerem que até 2025 os níveis de obesidade podem chegar a mais de 20% em nosso país. O Brasil poderá ser o quinto país do mundo a apresentar problemas de obesidade em sua população.

Mas por que os brasileiros que outrora estavam desnutridos atualmente estão obesos? Será que de alguma forma tais eventos (desnutrição e obesidade) estão relacionados?

Conforme abordamos na revisão da literatura, tanto a privação quanto o excesso de nutrientes em períodos específicos do desenvolvimento, tais como a lactação, possuem estreita relação com a obesidade e distúrbios da secreção de insulina através de um fenômeno conhecido como Programação Metabólica. Nesta direção entendemos que o excesso de peso corporal e doenças relacionadas têm suas origens nos primórdios da vida.

Considerando que o hormônio grelina interfere na secreção de insulina e no consumo de alimentos, o objetivo principal desta tese foi estudar a influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de insulina em camundongos *Swiss* adultos submetidos à hiperalimentação na lactação. Para atender a este propósito, nossa metodologia incluiu o isolamento de ilhotas pancreáticas por colagenase, *Western blotting* e respirometria de alta resolução; técnicas que nos permitiram encontrar resultados interessantes e esclarecedores relacionados aos mecanismos moleculares subjacentes à hipernutrição, Programação Metabólica e alterações na secreção de insulina.

## **1 REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1 Obesidade e diabetes mellitus tipo 2: Doenças do adulto com procedência na infância**

Pesquisas confirmam o aumento do sobrepeso e da obesidade em nosso país, tanto em adultos quanto em crianças. Identificou-se, por exemplo, que em Recife, Pernambuco, o sobrepeso e a obesidade atingiram 35% das 515 crianças na faixa escolar de 6 a 10 anos que participaram do estudo (BALABAN et al, 2001). Enquanto que em Salvador, Bahia, em uma análise de 387 escolares, a prevalência de obesidade alcançou 15,8% (SOUZA LEÃO et al, 2003). Já na cidade de Santos, São Paulo, um estudo realizado com 10.821 escolares, na faixa etária de 7 a 10 anos, mostrou uma prevalência de sobrepeso e obesidade de 15,7% e 18%, respectivamente, sendo os maiores índices em escolares de estabelecimentos privados (COSTA et al, 2006). Em relação à prevalência de sobrepeso e de obesidade na população adulta brasileira, identificou-se que mulheres e homens apresentaram respectivamente 40% e 41,1% de excesso de peso e 13,1% e 8,9% de obesidade (IBGE, 2002-2003).

Além dos aspectos psicossociais, o excesso de gordura corporal está associado à doença cardiovascular (ROBINSON et al, 2008), hipertensão arterial (RAHMOUNI, 2010), dislipidemias, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (GASTALDELLI, 2010, STUMVOLL et al, 2005; HANNON et al, 2005; STEINBERGER et al, 2003), síndrome metabólica (PANAMONTA et al, 2010), distúrbios respiratórios (ROMERO-CORRAL et al, 2010), alterações articulares (SOWERS et al, 2009) e aumento da incidência de câncer no endométrio, mama (ROSE et al, 2002), esôfago, rins, fígado, vesícula biliar e pâncreas (PERCIK et al, 2009).

A obesidade é um problema presente nas sociedades há muito tempo, contudo a compreensão dos seus aspectos etiológicos e fisiopatológicos mantém-se intrigante e desafiadora. O entendimento de como os fatores ambientais, tais como os nutrientes, interferem no funcionamento do tecido adiposo, pâncreas, comportamento alimentar e balanço energético precisa ser aprofundado.

As possíveis causas da obesidade e das doenças associadas são comumente atribuídas às questões de origem genética, à redução da atividade física e ao elevado consumo de alimentos de alta densidade calórica. Entretanto, como discutiremos a seguir, o impacto dos nutrientes no funcionamento do organismo no início da vida, tem estreita ligação com o aparecimento de enfermidades na idade adulta. Estudos apontam para evidências de que a obesidade e as patologias associadas, tais como a diabetes mellitus tipo 2, têm suas origens nos primórdios da vida.

De acordo com pesquisadores, tanto a privação quanto o excesso de nutrientes em fases específicas do desenvolvimento, tais como o período fetal ou neonatal, provoca alterações funcionais e estruturais no organismo que se perpetuam por toda a vida (WATERLAND & GARZA, 1999). Uma vez que o organismo é dotado de plasticidade ele é capaz de se “adaptar” à condição anômala de nutrientes no início da vida, todavia na idade adulta, frente a um ambiente de plena oferta alimentar, esta “adaptação” é desvantajosa, pois o organismo passa a apresentar maior suscetibilidade ao aparecimento de doenças como a obesidade e diabetes mellitus tipo 2 – Fenômeno conhecido como “Programação Metabólica” (GODFREY & BARKER, 2000).

A experiência documentada sobre o “Inverno da fome<sup>1</sup>” permitiu medir os efeitos da privação de alimentos na saúde humana. Desde 1976, Ravelli & Stein demonstraram o aumento da incidência de obesidade em homens de 19 anos de idade, cujas mães, residentes na Holanda em 1945, sofreram restrição alimentar no início da gravidez. Posteriormente, através de outros estudos (nesta mesma população, em décadas posteriores) foi identificada a associação da desnutrição materna com o aumento do risco para diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (GODFREY & BARKER, 2000).

Estudos epidemiológicos identificaram que filhos de mães com restrição protéico-calórica durante a gravidez apresentaram maiores risco de resistência à insulina e obesidade abdominal na vida adulta. Esses mesmos estudos identificaram hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 nessa geração que sofreu subnutrição na vida intra-uterina. Maiores riscos para a síndrome metabólica também foram descritos em crianças que apresentaram desnutrição grave no

---

<sup>1</sup> Período de restrição alimentar (500 Kcal/ dia) sofrida pela população holandesa das zonas costeiras em 1945.

primeiro ano de vida, seguida de retomada de crescimento (*catch-up*) com elevada velocidade (DEMMELMAN et al, 2006; LEVIT & LAMBERT, 2002).

A ligação do desenvolvimento da adiposidade na idade adulta com a privação nutricional no início da vida também pôde ser encontrada aqui no Rio de Janeiro, onde se identificou maiores prevalências de sobrepeso e obesidade em homens e mulheres de baixa estatura independente do consumo de alimentos na idade adulta. Sabendo-se que a estatura é um importante indicador do estado nutricional pregresso e que, portanto, a baixa estatura pode estar relacionada à desnutrição infantil (SIERVOGEL & ROCHE, 1991), este estudo reforçou a idéia de que o aparecimento do sobrepeso e da obesidade na idade adulta está associado a privação alimentar na infância (SICHERI et al, 2000).

Também, um estudo de coorte com dados relativos à população de Pelotas, Rio Grande do Sul, nascida em 1982, teve o intuito de verificar se os níveis da hemoglobina glicada (Hb A1c), um indicador dos níveis de glicemia, guardavam relação com o peso ao nascimento. Em 197 rapazes estudados aos 18 anos de idade, foi observada uma associação inversa entre a Hb A1c e o peso ao nascer para a idade gestacional. Essa associação permaneceu significativa após o ajuste para a renda familiar e índice de massa corpórea (NAZMI et al, 2007).

A obesidade, intolerância à glicose e doença cardiovascular na idade adulta também estão relacionadas ao consumo excessivo de nutrientes no início da vida. Constatou-se aumento da mortalidade por doença coronariana em adultos que foram obesos durante a infância ou que nasceram com baixo peso (SCHNEIDER, 2000; GALE et al, 2006).

As constatações provenientes de estudos epidemiológicos acerca de uma estreita associação entre distúrbios nutricionais no início da vida e seus efeitos prospectivos na idade adulta, tais como as doenças acima assinaladas são extremamente claras. Entretanto as bases fisiológicas deste processo são por sua vez ainda pouco claras, todavia evidências apontam que o hormônio insulina tem papel decisivo no binômio: distúrbios nutricionais no início da vida e enfermidades na idade adulta.

Estudos do nosso grupo apontaram que a desnutrição no início da vida é forte indutora do processo de impressão metabólica. Demonstramos que a desnutrição protéica nas nutrízes durante os 10 primeiros dias da lactação levou ao aumento da secreção de insulina nos filhotes machos Wistar associada à elevação do conteúdo

dos transportadores de glicose GLUT2 nas células  $\beta$  pancreáticas (COSTA et al, 2004), todavia na idade adulta detectamos que a desnutrição protéica na lactação associou-se ao comprometimento da capacidade secretora das células  $\beta$  pancreáticas dos ratos Wistar, especificamente diminuição da primeira fase da secreção de insulina (MOURA et al, 1997). Adicionalmente, após a realização de clampeamento hiperglicêmico e hiperinsulinêmico nos ratos Wistar adultos cujas mães foram submetidas à desnutrição protéica nos 10 primeiros dias de lactação, verificamos aumento da sensibilidade periférica à insulina (MOURA et al, 1997). Basicamente, a análise de nossos resultados sugeriu que os animais com distúrbios nutricionais no início da vida são capazes de melhor utilizar as fontes energéticas através do aumento da sensibilidade periférica à insulina na idade adulta.

## **1.2 Insulina: Processo de estímulo-secreção, ações periféricas e relação com a obesidade**

A insulina é uma molécula formada por duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfeto e é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso das células  $\beta$  pancreáticas, a partir da pré-pró-insulina que, ao direcionar-se ao complexo de Golgi é convertida em pró-insulina. A partir da atuação de enzimas ocorre a clivagem da pró-insulina em insulina e peptídeo C. A insulina é armazenada em grânulos, enquanto o peptídeo C sofre degradação hepática. A secreção de insulina é influenciada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células  $\beta$  pancreáticas, tais como os aminoácidos (notadamente no período de lactação) e a glicose – secretagogo mais importante na idade adulta (WICKESTEED et al, 2003).

A entrada de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas ocorre através do processo de difusão facilitada, com a participação de uma proteína integral de membrana, denominada GLUT2 – Transportador de glicose tipo 2 (HEIMBERG et al, 1995). Esta proteína, apresenta 524 aminoácidos e aproximadamente 55-kDa, possui um  $V_{max}$  e um  $K_m$  elevados (aproximadamente 17 mmol/ L) permitindo que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia se eleva. Após entrar nas células  $\beta$ , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) por duas enzimas: a hexoquinase IV (glicoquinase) que possui um  $V_{max}$  baixo e  $K_m$  elevado (entre 8 a 16 mmol/ L) e

a hexoquinase I que possui um baixo  $K_m$  ( $< 0,1 \text{ mmol/L}$ ). Entretanto, a enzima hexoquinase I é fortemente inibida pela G-6-P e, em menor grau, pela frutose-1-6-bifosfato, o que transfere para a glicoquinase o papel preponderante na fosforilação da glicose nas células  $\beta$ . Sugere-se que o GLUT2 e a glicoquinase se associam formando um complexo que atua no controle da entrada e do metabolismo da glicose nas células  $\beta$  pancreáticas (TAL et al, 1992).

Com a glicólise ocorre formação do piruvato no citoplasma o qual é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. Subsequentemente, a acetil-CoA entra no ciclo de Krebs levando a um aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>).

O metabolismo da glicose gera ATP e a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma (DEENEY et al, 2000). Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais para potássio ATP dependentes e a consequente despolarização da membrana celular levando a abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem. O aumento do influxo de cálcio para as células  $\beta$  resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e a exocitose da insulina (ASHCROFT, 2000), vide figura 1.

O acúmulo de cálcio no citosol das células  $\beta$  pancreáticas também promove a ativação da proteína Kinase Kinase Calmodulina dependente de cálcio (CaMKK) que por sua vez ativa a Proteína Kinase B (PKB), também conhecida como AKT (Castañeda et al, 2010). Enquanto a AKT ativada estimula a exocitose da insulina (BERNAL-MIZRACHI et al, 2004; CENNI et al, 2003; LANG et al, 1999), a proteína Kinase AMP (AMPK) ativada inibe a secreção de insulina, vide figura 1.

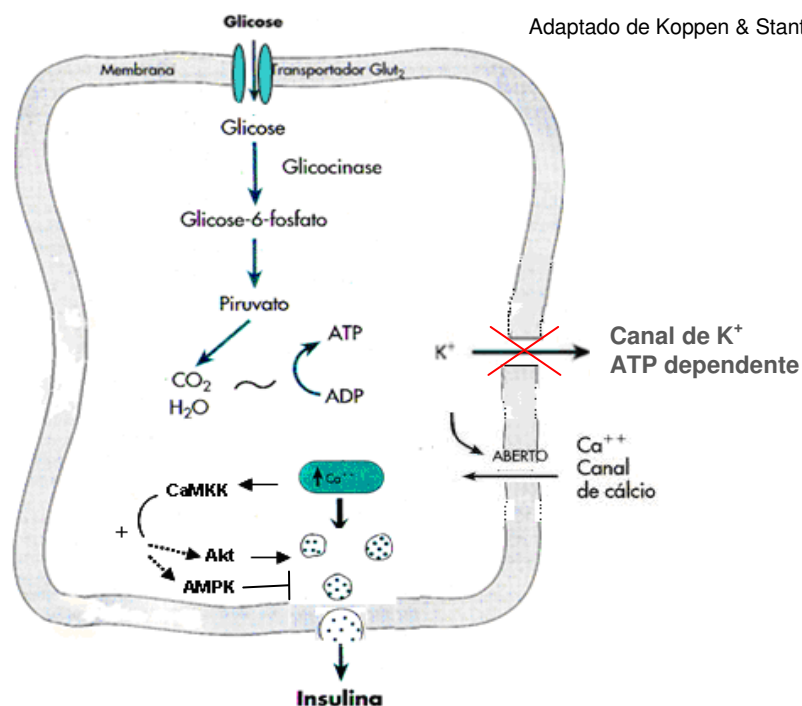


Figura 1: Processo de estímulo-secreção de insulina na célula  $\beta$  pancreática

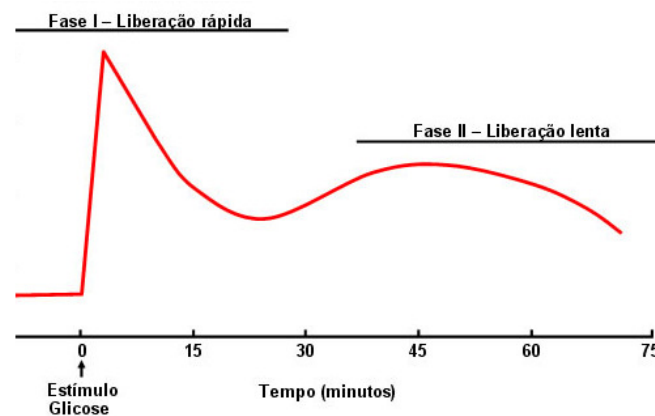
Destacamos ainda que a geração de ATP através do processo de fosforilação oxidativa está associada à formação de espécies reativas de oxigênio nas células  $\beta$  pancreáticas. Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo nestas células envolve a participação da proteína desacopladora tipo 2 – UCP2 (ROBSON-DOUCETTE et al, 2011; AFFOURTIT et al, 2011).

Sabe-se que a UCP2 está presente na membrana interna da mitocôndria da célula  $\beta$  pancreática (ZHANG et al, 2001) e tem a função de translocar prótons e elétrons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial com produção de calor durante a oxidação da glicose, por exemplo (RICQUIER et al, 1991). Tal mecanismo é importante na medida em que diminui o processo de redução do oxigênio, reação que gera 2 a 5% das espécies reativas de oxigênio (LAUGHLIN et al, 1990), as quais podem causar danos irreversíveis ao DNA da mitocôndria, membranas e proteínas intracelulares, provocando disfunção mitocondrial e posteriormente morte celular (ZHOU et al, 2000).

Em adição, ressalta-se que a UCP2 não se comporta como uma proteína desacopladora clássica nas células  $\beta$  pancreáticas. A partir de estudos em

camundongos transgênicos e em células de insulinoma INS-1, verificou-se que o aumento da expressão de UCP2 nas células  $\beta$  pancreáticas *per se* não modificou a secreção de insulina induzida pela glicose, aumento da razão ATP/ ADP e conteúdo de ATP citosólico (PRODUIT-ZENGAFFINEN et al, 2006).

A secreção da insulina é bifásica. A primeira fase da secreção é constituída pela insulina pré-formada e ocorre nos primeiros 10 minutos após o estímulo, sendo aguda, de curta duração e importante para o controle dos níveis glicêmicos pós-prandiais. Persistindo o estímulo glicêmico, ocorre a segunda fase da secreção de insulina, que é menos intensa e mais prolongada, vide figura 2.



Adaptado de Felig, 1971.

Figura 2: Secreção bifásica da insulina

Uma vez secretada, a insulina inicia sua ação ao se ligar ao seu receptor específico que está presente na membrana plasmática das próprias células  $\beta$  pancreáticas e em diversas outras células do organismo em concentrações que variam de 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (HABER, 2001).

O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  unidas por ligações dissulfeto. A subunidade  $\alpha$  é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A



subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase. O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e a autofosforilação do receptor nas subunidades  $\beta$  em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos, tais como as proteínas IRS – Substrato do Receptor de Insulina (EBINA et al, 1985; WHITE et al, 1988; PATTI & KAHN, 1998; PESSIN & SALTIEL, 2000). A fosforilação destes substratos provoca a ativação de uma diversidade de outras proteínas, tais como a AKT, que atuam de modo coordenado controlando a glicemia, a síntese e o armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas, o consumo de alimentos e a secreção de insulina através do processo de autoregulação das células  $\beta$  pancreáticas, vide figura 3.

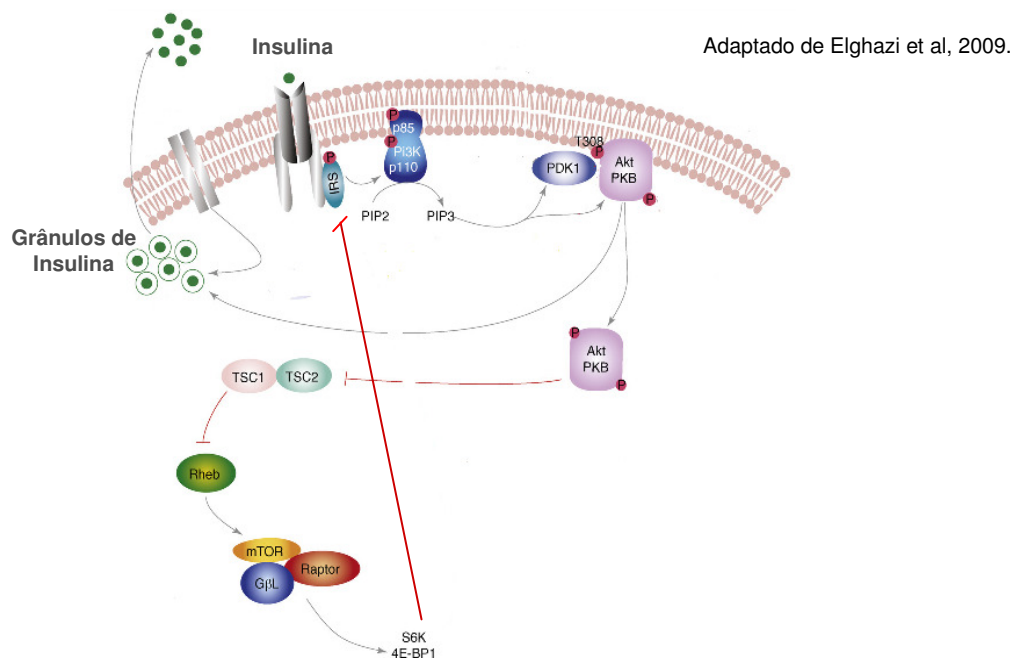


Figura 3: Autoregulação da célula  $\beta$  pancreática pela insulina

Uma vez fosforiladas, as proteínas IRS1 e IRS2 se ligam à subunidade regulatória (p85) da molécula PI3-K (fosfoinositídeo 3-quinase), que promove a ativação da subunidade p110. A subunidade p110 catalisa a fosforilação de fosfoinositídeos de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que regula a

proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1), uma serina/ treonina quinase que fosforila e ativa a enzima AKT. Nas células  $\beta$  pancreáticas a AKT estimula a liberação de insulina e também a síntese protéica e replicação celular através da enzima alvo mamífero de rampamicina – mTOR (ELGHAZI et al, 2009). Além disso, a AKT ativada participa do processo de translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) do citossol para a membrana plasmática no tecido adiposo, muscular esquelético e cardíaco para promover aumento da captação de glicose do sangue e controle da glicemia. Adicionalmente, através da AKT, a insulina controla a síntese do glicogênio no fígado e no músculo esquelético, inativando a glicogênio-sintase kinase 3 (GSK3) e ativando a glicogênio sintetase (ZECCHIN et al, 2004).

A insulina estimula a síntese de lipídios e inibe sua degradação. Em adipócitos, a glicose é primariamente armazenada como lipídio devido à ativação de enzimas incluindo a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil-CoA em malonil-CoA, e a ácido graxo sintase (FAS), que converte a malonil-CoA em palmitato. O bloqueio da lipólise em adipócitos é possível devido à inibição da enzima lipase lipoprotéica (LPL). A LPL é ativada pela PKA (proteína quinase A) que por sua vez é inibida pela insulina (SALTIEL & KAHN, 2001). A insulina também regula a síntese de lipídios através dos fatores de transcrição SREBP (Proteínas ligadoras do elemento regulatório de estero). No fígado, o SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese das enzimas ACC e FAS (ZECCHIN et al, 2004). Em períodos de excesso de carboidratos, a insulina estimula a síntese de ácidos graxos no fígado.

A insulina ainda atua no crescimento muscular esquelético via mTOR. A partir da ligação da insulina ao seu receptor há ativação da PI3K que por sua vez ativa o complexo mTOR que fosforila a AKT em resíduos de serina 473. Estando ativada, a AKT leva à inibição de ubiquitinas ligases bloqueando o processo de degradação protéica. Por outro lado, com a ativação do complexo mTOR ocorre a fosforilação da proteína p70-ribossomal S6 kinase (p70<sup>rsk</sup>) que por sua vez promove o crescimento através da indução de processos miogênicos de diferenciação celular e do aumento do volume citoplasmático dos mioblastos (SALTIEL & KAHN, 2001; GLASS, 2005; PENDE, 2006).

A ação insulínica possui estreita relação com o tecido adiposo, tipo especial de tecido conjuntivo no qual predomina o adipócito. Sabe-se que o tecido adiposo

produz vários hormônios (também chamados de adipocinas ou adipocitocinas) que influenciam na sensibilidade à insulina, tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e adiponectina (FRIED et al, 1998; FAIN et al, 2004; MINER, 2004). O acúmulo excessivo de tecido adiposo (sobrepeso ou obesidade) representa a quebra do intrincado equilíbrio metabólico que mantém estável, não só o peso corporal do indivíduo, mas também o funcionamento adequado dos seus sistemas fisiológicos.

Sabe-se que enquanto o TNF- $\alpha$  atua na supressão de GLUT4 no tecido adiposo, a adiponectina aumenta a utilização de glicose no músculo esquelético (CIGOLINI et al, 1999; RAJALA & SCHERER, 2003). Além disso, a adiponectina também age nas células  $\beta$  pancreáticas elevando a secreção de insulina (GU et al, 2006). Entretanto, quando há excesso de gordura no corpo ocorre mudança do perfil de secreção destas adipocinas, ou seja, a secreção de TNF- $\alpha$  aumenta e a liberação de adiponectina reduz favorecendo a diminuição da sensibilidade à insulina.

Tem sido amplamente descrito que na obesidade os níveis de adiponectina estão diminuídos (LUIS et al, 2009; VETTOR et al, 2005; LIHN et al, 2005; SHARMA & TARNOPOLOSKY, 2005; TRUJILLO & SCHERER, 2005), enquanto os níveis de TNF (XU & LAZAR et al, 2003) e do hormônio resistina (ADEGHATE et al, 2004; STEPPAN, 2004; DYCK et al, 2006; McTERNAN et al, 2006) e leptina (SINHA & CARRO, 1998; JÉQUIER & TAPPY, 1999) estão elevados. O perfil de secreção destas adipocinas interfere na sensibilidade periférica à ação insulínica e consequentemente no metabolismo de carboidratos na obesidade.

A diminuição da sensibilidade à ação insulínica é entendida como uma diminuição da capacidade de resposta dos tecidos insulino-sensíveis (fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, hipotálamo e coração) às concentrações fisiológicas de insulina plasmática. A consequência da diminuição da sensibilidade à insulina, em nível periférico, é a redução da captação de glicose, aumento da gliconeogênese hepática e hiperglicemia constante. Esse estado hiperglicêmico, por sua vez eleva a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas – Situação conhecida como hiperinsulinemia compensatória (GUNGOR & ARSLANIANS, 2002; STUMVOLL et al, 2005; STEINBERGER & DANIELS, 2003; STEINBERGER et al, 2001; WEYER et al, 1999).

Havendo o comprometimento da primeira fase da secreção de insulina, ocorre a manifestação clínica da diabetes mellitus tipo 2 na forma de hiperglicemia, poliúria,

polifagia e polidipsia (STEINBERGER & DANIELS, 2003; STEINBERGER et al, 2001; WEYER et al, 1999).

Nos últimos anos os hormônios gastrointestinais têm alcançado grande destaque por suas ações relacionadas às células  $\beta$  pancreáticas (HOLNESS et al, 2011; GRANATA et al, 2007) e a remissão da diabetes mellitus tipo 2 (NALEPA et al, 2011), além da regulação do comportamento alimentar (GIL-CAMPOS et al, 2006; HOSODA & KOJIMA, 2002; NAKAZATO et al, 2001). Sendo assim, nas próximas páginas destacaremos algumas considerações sobre o hormônio grelina. Abordaremos especificamente aspectos relacionados à influência da grelina no consumo de alimentos, homeostase glicêmica e secreção de insulina.

### **1.3 Grelina: Influência no consumo de alimentos, homeostase glicêmica e secreção de insulina**

A grelina, hormônio peptídico inicialmente isolado do estômago de roedores é um estimulador do hormônio do crescimento – GH (KOJIMA et al, 1999; KOJIMA et al, 2001; ARVAT et al, 2000 & 2001; BROGLIO et al, 2001; ASAKAWA et al, 2001; WREN et al, 2001). Desde que foi descoberta sua capacidade de estimular a secreção de GH, outros efeitos da grelina têm sido demonstrados, incluindo a regulação da apoptose (GRANATA et al, 2007), inflamação, reprodução (MARTIN et al, 2011) e metabolismo (SEOANE et al, 2004).

A grelina circulante é primordialmente produzida no estômago, mas menores quantidades deste hormônio são formadas no intestino, hipófise, hipotálamo, placenta, rins, coração e pulmões (HOLST et al, 2003; KOJIMA et al, 1999; DATE et al, 2000; PAPOTTI et al, 2000; GUALILLO et al, 2001). Também tem sido encontrada produção de grelina pelas células  $\alpha$  e  $\beta$  pancreáticas e mais recentemente pelas células  $\epsilon$  do pâncreas (WIERUP et al, 2002). Parte da grelina produzida sofre acilação (introdução de um grupo acila) pelo ácido graxo octanóico, modificação que diminui sua oxidação e é essencial para sua atividade (HOSODA et al, 2003; GIL-CAMPOS et al, 2006). A acilação da grelina é catalizada pela grelina O-aciltransferase (GOAT), enzima que é bastante expressa no estômago e pâncreas (GUTIERREZ et al, 2008).

As formas acilada e desacilada da grelina coexistem na circulação. A quantidade de grelina acilada é menor que 10% do total de grelina; a maior parte da grelina circulante é a do tipo desacilada (SANGAIO-ALVARELLOS & CORDIDO, 2010). A grelina desacilada não interfere na secreção de GH (SANGAIO-ALVARELLOS & CORDIDO et al, 2010), todavia demonstrou efeito cardioprotetor e antiproliferativo em células neoplásicas (DATE et al, 2000; KAMEGAI et al, 2001; MASUDA et al, 2000; MUCCIOLI et al, 2000; TSCHOP et al, 2000; ARVAT et al, 2001; CASSONI et al, 2001).

A grelina acilada se liga ao receptor do secretagogo do hormônio de crescimento tipo 1A – GHSR1A (SUN et al, 2005), que faz parte de uma grande família de receptores acoplados a proteína G. A proteína G é formada por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A subunidade  $\alpha$  possui um sítio de ligação com o GTP ou GDP. As subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  permanecem sempre unidas. Quando a grelina acilada se liga ao GHSR1A, ela induz uma mudança conformacional no receptor que permite a troca de GTP pela molécula de GDP que está na subunidade  $G_\alpha$ . Em seguida há dissociação da subunidade  $G_\alpha$  (que está ligada ao GTP) do dímero  $G_{\beta\gamma}$  e do receptor. Ambas,  $G_\alpha$ -GTP e  $G_{\beta\gamma}$  podem ativar diferentes proteínas efetoras através de um segundo mensageiro como o fosfatidilinositol trifosfato – IP3 (CASTAÑEDA et al, 2010). A molécula de GTP ligada é finalmente hidrolizada pela subunidade  $G_\alpha$ , tornando-se GDP, o que permite a recombinação da subunidade  $G_\alpha$  com o dímero  $G_{\beta\gamma}$  e o início de um novo ciclo.

O receptor da grelina está presente na glândula pituitária, núcleo arqueado e ventromedial hipotalâmico (GUAN et al, 1997; HOWARD et al, 1996), giro denteado, hipocampo, substância negra, área tegmental e núcleo de raphe (NAKAZATO et al, 2001). Análises de RT-PCR demonstraram a expressão de RNAm em outros tecidos incluindo coração, fígado, rins, pulmões, pâncreas, estômago, intestinos, adipócitos e células do sistema imunológico (GNANAPAVAN et al, 2002; HATTORI et al, 2001; KOJIMA et al, 2001), indicando que a grelina é um hormônio que exerce múltiplas funções (BROGLIO et al, 2003).

Alimentar-se é um comportamento básico necessário à vida. Como visto anteriormente, o apetite é regulado por complexos mecanismos que envolvem o sistema nervoso central, particularmente o hipotálamo e hormônios secretados por tecidos periféricos (NEARY et al, 2004; SMALL & BLOOM, 2004; UKKOLA, 2004; WYNNE et al, 2004). Enquanto a insulina e a leptina suprimem o apetite

(FRIEDMAN, 2002) a grelina estimula o consumo de alimentos (NAKAZATO et al, 2001; HOSODA et al, 2002; MINOKOSHI et al, 2004; CASTAÑEDA et al, 2010). A grelina acilada envia sinais de fome quando o organismo encontra-se em balanço energético negativo<sup>2</sup>, de forma que seus níveis plasmáticos aumentam imediatamente antes de cada refeição e diminuem por um período de 30 a 60 minutos após a alimentação (CUMMINGS et al, 2001; TSCHOP et al, 2001; CARLSON et al, 2009).

A grelina acilada se liga ao seu receptor específico e estimula os neurônios orexigênicos: Neuropeptídio Y (NPY) e Peptídio Relacionado à Agouti (AgRP), e inibe neurônios anorexigênicos tipo Pró-Ópiomelanocortina – POMC (GIL-CAMPOS et al, 2006; HOSODA et al, 2002). Ressalta-se que a grelina bloqueia a ação anorexigênica da insulina e da leptina pela inibição dos receptores MC4 hipotalâmicos (NAKAZATO et al, 2001; HOSODA et al, 2002).

Adicionalmente, a grelina acilada atua na regulação hipotalâmica do apetite via proteína kinase AMP – AMPK e AKT (MINOKOSHI et al, 2004; CASTAÑEDA et al, 2010). A partir da ligação da grelina ao GHSR1A há ativação da fosfolipase C (PLC) e geração de fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) e diacilglicerol (DAG). O DAG ativa a proteína kinase C (PKC) que abre os canais de cálcio da membrana plasmática permitindo a entrada de cálcio no meio intracelular. O PIP<sub>2</sub> gera fosfatidilinositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que atua nos canais de cálcio do retículo endoplasmático levando ao aumento de cálcio no citosol. O acúmulo de cálcio no interior da célula estimula a atividade da proteína cálcio-calmodulina kinase kinase que ativa a AKT e a AMPK estimulando a fome (Castañeda, 2010). A AMPK também pode ser ativada de forma direta pela grelina acilada (CASTAÑEDA, 2010).

De acordo com diferentes estudos os níveis da grelina plasmática de jejum são significativamente mais altos em indivíduos eutróficos em comparação aos obesos (ENGLISH et al, 2002; YILDIZ et al, 2004; MONTI et al, 2006; OTTO et al, 2001; LE ROUX et al, 2005; TSCHOP et al, 2001; SHIYA et al, 2002; ESPELUND et al, 2005). Sabendo-se que os níveis plasmáticos de grelina possuem correlação inversa com os estoques de energia corporal, baixos níveis de grelina plasmática são esperados em indivíduos obesos, pois estes estão em constante estado de balanço energético positivo<sup>3</sup>. Todavia, é interessante destacar que a análise da

---

<sup>2</sup> O total de calorias ingeridas é menor que o gasto calórico do corpo.

<sup>3</sup> O total de calorias consumidas é maior que o gasto calórico do corpo.

grelina plasmática pós-prandial revelou que a resposta deste hormônio a refeição é menos pronunciada em obesos (ENGLISH et al, 2002; WEIGLE et al, 2003; LE ROUX et al, 2005; CUMMINGS et al, 2003; LOMENICK et al, 2008), o que em parte<sup>4</sup> explica o fato dos indivíduos obesos demorarem mais que as pessoas eutróficas para se saciarem, ou seja, o porquê dos obesos comerem por um período de tempo maior e ingerirem muitas calorias (CARLSON et al, 2009).

Além de induzir o consumo de alimentos, a grelina acilada contribui de maneira importante para a manutenção da homeostase glicêmica ao regular a gliconeogênese hepática e a síntese de glicogênio no jejum, situação em que seus níveis circulantes estão aumentados (TSCHOP et al, 2000; ARIYASU et al, 2001).

Ao se ligar ao GHSR1A dos hepatócitos, a grelina atua em proteínas da via de sinalização da insulina relacionadas ao metabolismo de carboidratos. A grelina acilada diminui a fosforilação da AKT e reduz a fosforilação da kinase-3 da glicogênio sintase – GSK3 (BARAZZONI et al, 2007). Há aumento da fosforilação da glicogênio sintase que diminui sua atividade e reduz a síntese de glicogênio. A grelina ainda aumenta a expressão de PGC1 $\alpha$  (Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma), um componente transcripcional que ativa a gliconeogênese – processo de formação de glicose importante para a manutenção adequada da glicemia no jejum (BARAZZONI et al, 2007; YOON et al, 2001).

A ação da grelina acilada na via gliconeogênica foi sustentada em experimento de cultura de células. Demonstrou-se que a grelina preservou a produção de glicose em células H4-II-E (linhagem de hepatoma de rato) ao atenuar o efeito inibitório da insulina na expressão da enzima gliconeogênica PEPCK – Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (MURATA et al, 2002).

A grelina também contribui para a manutenção da homeostase glicêmica aumentando a sensibilidade à insulina no tecido adiposo. Foi visto que adipócitos isolados da região epididimal tratados com grelina em presença de insulina apresentaram maior captação de glicose (PATEL et al, 2006). Além disso, verificou-se que adipócitos diferenciados 3T3-L1 incubados com insulina e grelina exibiram aumento da atividade da via IRS-1/ PAKT em comparação com os adipócitos incubados somente com insulina (KIM et al, 2004).

Acrescenta-se que no tecido adiposo branco, a grelina acilada estimula a lipogênese ao elevar os níveis de RNAm de enzimas que promovem o

---

<sup>4</sup> O consumo de alimentos é controlado por hormônios, tais como: grelina, insulina e leptina.

armazenamento de gorduras: Lipase lipoprotéica (LPL), Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e Ácido Graxo Sintase – FAS (THEANDER-CARRILLO et al, 2006). A grelina acilada também reduz a utilização de gorduras (WREN et al, 2001) ao inibir a Carnitina Palmitoil Transferase-1 (CPT1), uma enzima importante na  $\beta$ -oxidação (THEANDER-CARRILLO et al, 2006). Tais efeitos contribuem para a acumulação de ácidos graxos e aumento da adiposidade em longo prazo (PATEL et al, 2006).

A ação lipogênica da grelina foi confirmada em outros estudos. Observou-se que após a administração intracerebroventricular de grelina em roedores houve hiperfagia, diminuição do gasto energético e aumento de adiposidade (KAMEGAI et al, 2001; NAKAZATO et al, 2001; SHINTANI et al, 2001; TSCHOP et al, 2000; WREN et al, 2001).

Com relação ao papel fisiológico da grelina na secreção de insulina tem sido demonstrado que a grelina acilada é capaz tanto de estimular quanto de inibir a secreção de insulina. Talvez por causa das diferentes condições experimentais, a grelina tenha apresentado ação inibitória na secreção de insulina em alguns estudos, mas em outros a grelina estimulou a liberação de insulina. Por exemplo, a grelina exógena suprimiu a secreção de insulina em pâncreas isolado de camundongos (EGIDO et al, 2002), em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos e de ratos (BROGLIO et al, 2001; EGIDO et al, 2002; REIMER et al, 2003) e em cultura de células  $\beta$ -pancreáticas (WIERUP et al, 2002). Em contraste, a grelina aumentou a liberação de insulina em ratos saudáveis e diabéticos (ADEGHATE et al, 2002; DATE et al, 2002; LEE et al, 2002).

Em humanos, constatou-se que a administração intravenosa de grelina diminuiu a insulina plasmática e aumentou a concentração da glicose sanguínea de jejum, todavia tais alterações na insulinemia e na glicemia não foram detectadas após a administração de grelina em diferentes concentrações (BROGLIO et al, 2001).

Em relação aos possíveis mecanismos de ação da grelina na secreção de insulina tem sido proposto que a grelina pode afetar a secreção de insulina de forma direta através da atuação em canais de potássio ATP dependentes (VOLANTE et al, 2002; YADA et al, 2008) e também de forma indireta ao interferir na produção de acetilcolina<sup>5</sup> e de adrenalina<sup>6</sup> (MEYER, 2010).

---

<sup>5</sup> Neurotransmissor que se liga aos receptores muscarínicos nas células  $\beta$  pancreáticas e estimula a secreção de insulina.

<sup>6</sup> Catecolamina que se liga aos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos nas  $\beta$  pancreáticas e inibe a secreção de insulina.



Sabe-se que a grelina também exerce seus efeitos através da ativação das proteínas AKT e AMPK em diferentes tecidos, tais como hipotálamo, fígado e adipócitos (SANGAIO-ALVARELLOS & CORDIDO et al, 2010; CASTAÑEDA et al, 2010), todavia ainda são poucos os estudos que relacionam as ações da grelina às vias de sinalização da AKT, AMPK e UCP2 especificamente nas ilhotas pancreáticas (WANG et al, 2010; GRANATA et al, 2007).

É importante ressaltar que 30% a 40% dos diabéticos que utilizam medicação oral, tais como sulfoniluréias, metiformina e tiazolidinedionas não alcançam um controle adequado da glicemia e então passam a utilizar insulina exógena para restaurar a normoglicemia, todavia tal terapia pode conduzir a hipoglicemia – consequência potencialmente fatal (SANGAIO-ALVARELLOS & CORDIDO, 2010). Desta forma, a descoberta e a utilização de novos tipos de tratamento para um controle mais eficaz da diabetes mellitus tipo 2 fazem-se necessárias.

Sabendo-se que a grelina possui efeito determinante na homeostase glicêmica e na secreção de insulina, acredita-se que a manipulação de suas vias de sinalização poderá ser útil no tratamento da diabetes mellitus tipo 2. Como exemplo, destacamos que o substrato peptídico denominado Go-CoA-Tat mostrou-se capaz de inibir a GOAT (BARNETT et al, 2010). A administração intraperitoneal deste peptídeo sintético reduziu a intolerância à glicose e diminuiu o ganho de peso corporal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, todavia tais efeitos não foram detectados em camundongos deficientes de grelina, indicando que os benefícios metabólicos alcançados neste modelo experimental foram devido à inibição da GOAT (BARNETT et al, 2010; COSTANTINO, 2010).

Entendemos que é fundamental uma melhor compreensão da dinâmica entre grelina, insulina e nutrição pregressa. A caracterização do perfil de secreção de insulina em presença da grelina acilada e o entendimento da modulação de proteínas específicas das vias de sinalização envolvidas neste processo, tais como GLUT2, AKT, AMPK, UCP2 e GHSR1A, abre caminhos para futuras intervenções que visam o controle da diabetes mellitus tipo 2 e enfermidades associadas. Sendo assim, este trabalho se justifica ao investigar a influência da grelina acilada sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em camundongos *Swiss* machos adultos hiperalimentados na lactação.

Antes de apresentarmos nossa hipótese faz-se necessário discorrer a respeito do modelo de hiperalimentação adotado neste estudo. A seguir,

reforçaremos as consequências do desequilíbrio nutricional no início da vida e apontaremos significativas alterações morfofuncionais encontradas em roedores submetidos à hiperalimentação através da redução do tamanho da ninhada.

#### **1.4 MODELO DE HIPERALIMENTAÇÃO ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA NINHADA**

Durante a gestação, as ilhotas pancreáticas têm um rápido crescimento devido aos processos de replicação e maturação de células precursoras encontradas nos ductos pancreáticos (HILL & HOGG, 1991; KAUNG, 1994). Após o nascimento, a taxa de crescimento das ilhotas declina em torno de 3 a 4 dias, mas continua a acontecer um remodelamento das mesmas durante 2 a 3 semanas de vida (FINEGOOD & SCAGLIA, 1995; SCAGLIA & SMITH, 1995). Neste período, os processos de neogênese e de apoptose preparam as ilhotas pancreáticas para o metabolismo pós-natal, de modo que as ilhotas responsivas a aminoácidos são substituídas por ilhotas que apresentam secreção aguda de insulina em presença de glicose (HILL & DUVILLIE, 2000). Entretanto, quando o organismo encontra-se diante da situação de privação ou excesso de nutrientes na gestação ou na lactação os processos de remodelamento, neogênese e apoptose no pâncreas são perturbados, modificados.

Foi demonstrado que a desnutrição materna afetou o desenvolvimento do pâncreas e de outros órgãos na prole de roedores. O baixo consumo de proteínas na gestação comprometeu a capacidade proliferativa das ilhotas pancreáticas dos filhotes e também alterou a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos (BERNEY & DESAI, 1997; LATORRACA et al, 1998). Além disso, a desnutrição materna levou a redução da vascularização do córtex cerebral prejudicando o desenvolvimento hipotalâmico dos filhotes (BENNIS-TALEB & REMACLE, 1999). Em adição, o nosso grupo encontrou modificações no comportamento alimentar e alterações da insulina e leptina plasmática em roedores de 21 e 60 dias de vida cujas mães foram desnutridas na lactação (MOURA et al, 2002).

Corroborando os estudos de Plagemann e colaboradores (1992 & 1999), o nosso grupo de pesquisa tem demonstrado significativas alterações morfofuncionais em roedores submetidos à hiperalimentação devido à redução da ninhada.

Constatamos que a hiperalimentação na lactação induziu a hipertrofia cardíaca de roedores aos 21 dias de idade (MOREIRA et al, 2009). Identificamos que o excesso de nutrientes na lactação aumentou o conteúdo do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3), elevou o conteúdo das proteínas Fosfatidilinositol-3-kinase (PI3-K) e Janus Kinase-2 (JAK2) no coração de roedores com 21 dias de idade (PEREIRA et al, 2006) e aumentou o conteúdo de PTP1B no coração de roedores na idade adulta (MARTINS et al, 2008).

Também confirmamos a importância deste modelo experimental de hiperalimentação no pâncreas. Demonstramos que a hiperalimentação na lactação aumentou a secreção de insulina *in vitro* e elevou o conteúdo de GLUT2 no pâncreas de ratos *Wistar* com 1 ano de idade. Verificamos ainda que roedores hiperalimentados na lactação exibiram hiperfagia, elevação da gordura visceral e da insulina plasmática de jejum (CUNHA et al, 2009).

Considerando as informações descritas anteriormente, justificamos a utilização do modelo de hiperalimentação através da redução da ninhada em camundongos *Swiss* porque o mesmo está associado à presença das seguintes alterações:

- ✓ Aumento do peso corporal e da gordura visceral em roedores aos 21 dias de vida e na idade de 1 ano.
- ✓ Hiperfagia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia em roedores aos 21 dias de vida e na idade de 1 ano.
- ✓ Elevação do conteúdo de Fosfatidilinositol-3-kinase (PI3-K), Janus Kinase-2 (JAK2) e de ativadores de transcrição-3 (STAT3) no coração de roedores com 21 dias de idade.
- ✓ Hipertrofia cardíaca em roedores com 21 dias de idade.
- ✓ Intolerância à glicose em camundongos *Swiss* com 90 dias de idade.
- ✓ Elevação da secreção de insulina *in vitro* na idade de 1 ano.
- ✓ Maior conteúdo de GLUT2 no pâncreas de roedores com 1 ano de idade.
- ✓ Elevação da proteína PTP1B no coração de roedores aos 150 dias.

Em adição, o modelo de hiperalimentação através da redução de ninhada apresenta vantagem econômica, pois para sua implementação não é necessário realizar investimento financeiro em aparelhos para aleitamento artificial como ocorre, por exemplo, no modelo “*pup in a cup*” que consiste em administrar leite artificial rico

em carboidratos através de cânula via intragástrica em filhotes de roedores no período de lactação (SRINIVASAN & LAYCHOCK, 2003).

## 2 HIPÓTESE

A grelina acilada interfere na 1ª e na 2ª fase da secreção de insulina *in vitro* de camundongos *Swiss* adultos hiperalimentados e controle, sendo que tal efeito é mediado pela via de sinalização da AKT, AMPK e UCP2 e envolve a participação dos transportadores de glicose tipo 2 – GLUT2.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a influência da grelina sobre o processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose em camundongos *Swiss* machos adultos hiperalimentados na lactação bem como nos camundongos controle.

#### **3.2 Objetivos específicos propostos para os animais hiperalimentados aos 120 dias de idade e seus respectivos animais controle**

- ✓ Analisar o ganho de peso corporal dos camundongos *Swiss* a partir do nascimento até a idade adulta.
- ✓ Estudar a relação do peso corporal com a distância naso-anal.
- ✓ Avaliar a composição corporal (gordura corporal total e proteína corporal) e a gordura retroperitoneal.
- ✓ Medir a glicose plasmática de jejum, bem como a insulinemia e a grelinemia de jejum.
- ✓ Verificar a secreção de insulina *in vitro* das ilhotas pancreáticas em presença de glicose com e sem grelina.
- ✓ Investigar os conteúdos de GHSR1A, GLUT2, PAKT, PAMPK e UCP2 das ilhotas pancreáticas em presença de glicose com e sem grelina.
- ✓ Mensurar o consumo de oxigênio das ilhotas pancreáticas em presença de glicose com e sem grelina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Modelo de hiperalimentação através da redução de ninhada

Fêmeas *Swiss* com 3 meses de idade fornecidas pelo Instituto Vital Brasil ao biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento pertencente ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), foram mantidas a temperatura média de 23<sup>o</sup> C e ciclo de luminosidade de 12 horas (claro e escuro). Após acasalamento, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial Labina® e água *ad libitum* durante todo o período de gestação.

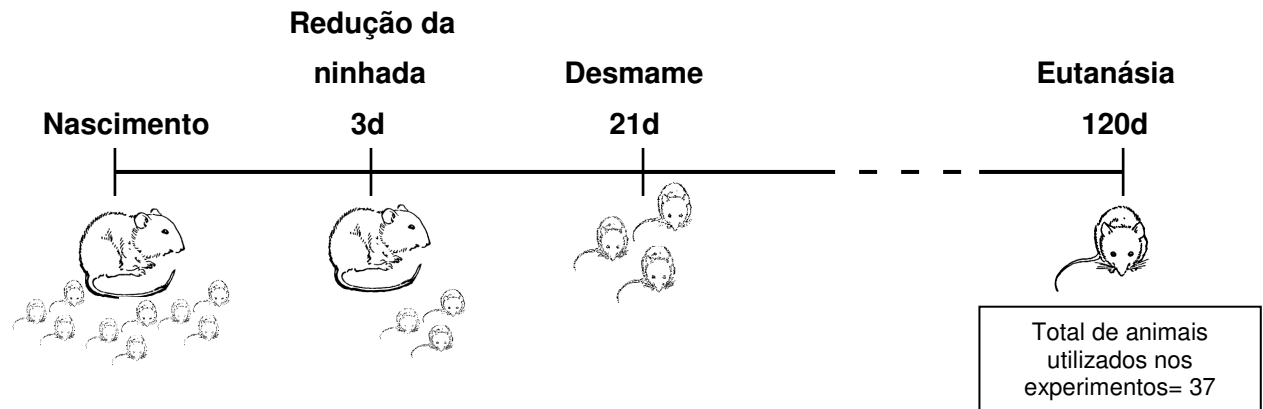
Ao nascimento dos filhotes, foram formadas ninhadas de 9 filhotes machos por lactante. No 3<sup>o</sup> dia de vida, as ninhadas foram reduzidas a 3 filhotes por lactante para indução da hiperalimentação e permaneceram assim até o final da lactação. Outras ninhadas foram preservadas com 9 filhotes por lactante desde o nascimento até os 21 dias de vida (final da lactação) para servirem como controle das ninhadas reduzidas (PLAGEMANN et al, 1999), vide figura 4.

Aos 21 dias de idade os filhotes foram separados das lactantes e alocados em gaiolas coletivas para ninhadas reduzidas e para ninhadas controle, tendo sido agrupados 3 animais por gaiola. Após o desmame os animais receberam ração comercial Labina® contendo 23% de proteína e água *ad libitum* até o momento da realização dos experimentos.

O ganho de peso corporal foi acompanhado desde o nascimento até os animais completarem 120 dias de vida. Nesta data verificou-se a distância naso-anal, composição corporal, gordura retroperitoneal, glicemia, insulinemia, grelinemia, secreção de insulina *in vitro*, consumo de O<sub>2</sub> e conteúdo de proteínas-chave relacionadas à sinalização da insulina, tais como: GHSR1A, GLUT2, PAKT, PAMPK e UCP2 nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e animais controle.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais tendo sido obtida aprovação do protocolo de N<sup>o</sup> 050/2011 pela Comissão de Ética em pesquisa desta universidade.

### Animais Hiperalimentados



### Animais Controle

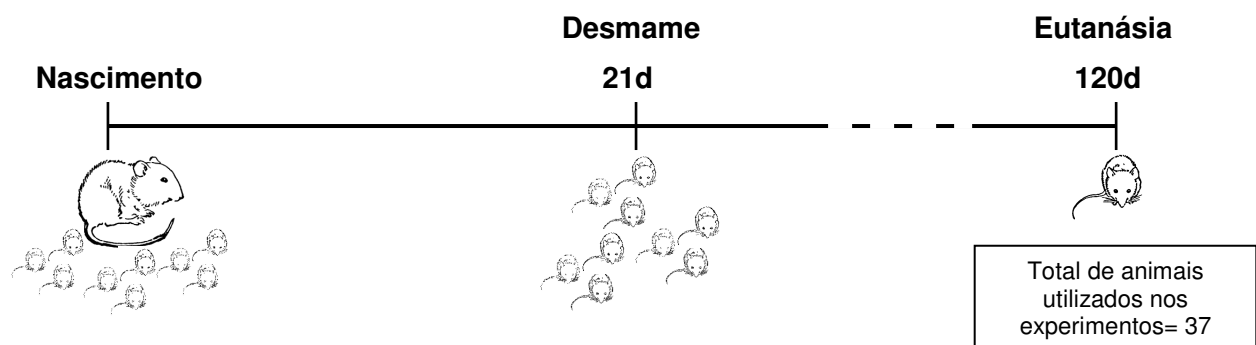


Figura 4: Esquema de organização dos animais hiperalimentados e controle



## 4.2 Ganho de peso corporal

Submetemos os camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle à pesagem em balança de precisão no 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de vida. Ao completar 30 dias de idade estes animais passaram a ser pesados mensalmente até aos 120 dias.

## 4.3 Crescimento naso-anal

Verificamos os comprimentos naso-anais dos camundongos *Swiss* machos hiperalimentados através da utilização de fita métrica (C&C®, Brasil) aos 120 dias de vida.

## 4.4 Índice de Lee

Calculamos os Índices de Lee (IL) dos camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle de 120 dias de idade através da fórmula descrita por Bernardis (1968), demonstrada a seguir.

$$IL = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}}}{\text{Distância naso-anal (mm)}} \times 10^4$$

## 4.5 Peso da gordura retroperitoneal

Retiramos e pesamos a gordura da região retroperitoneal dos camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle com 120 dias de idade na balança de precisão modelo BD-600 (*Instrutherm*®, Brasil).

#### 4.6 Avaliação da composição corporal

Submetemos os camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle com 120 dias de idade à avaliação da composição corporal pela absorciometria de feixe duplo (DEXA – *dual X-ray absorptiometry*). Foi utilizado um programa específico fornecido pela *GE Healthcare* para registro do percentual de gordura e da massa corporal livre de gordura.

#### 4.7 Identificação da glicemia

Após 12 horas de jejum, realizamos venossecção na cauda e verificamos a glicose plasmática dos camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle através da utilização de glicofita (*ACCU-CHEK Active®*) aos 120 dias de vida. Os resultados foram expressos em mg/dl.

#### 4.8 Dosagem da grelina plasmática

Após 6 horas de jejum, anestesiámos os animais com Avertin (0,02 ml/ g de peso) e realizamos a coleta de sangue através de punção cardíaca. Posteriormente, as amostras de sangue foram vertidas em tubos de ensaio contendo EDTA e adicionou-se PMSF (10µL/ ml de sangue). Em seguida os tubos foram centrifugados a 3.000 G durante 15 minutos. Os plasmas dos camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle de 120 dias foram coletados, adicionados de HCL 5N (10µL/ ml de plasma) e aliquotados em *eppendorfs* que foram mantidos a -20<sup>0</sup> C para quantificação da grelina através do método de Elisa utilizando-se “kit” comercial (*Millipore®*, EUA).

Lavamos a placa de Elisa com solução de lavagem e pipetamos 20 µl de solução matrix nos poços onde ficaram o branco, a curva padrão e os controles de qualidade. Adicionamos tampão de ensaio nos poços onde ficaram o branco, os controles de qualidade e as amostras de plasma. Pipetamos 20 µl dos padrões, da

grelina reconstituída, dos controles de qualidade reconstituídos e das amostras de plasma. Acrescentamos 50 µl da solução de anticorpos e realizamos incubação a 22° C por 2 horas. Vertemos o conteúdo da placa, lavamos os poços com solução de lavagem, adicionamos 100 µl de solução enzimática e incubamos por 30 minutos. Novamente vertemos o conteúdo da placa, lavamos os poços com solução de lavagem, adicionamos 100 µl de solução substrato, incubamos por 15 minutos até aparecer a cor azul e acrescentamos 100 µl de solução *stop*. Fizemos leitura dual através dos comprimentos de onda de 450 nm e 590 nm em espectrofotômetro de microplacas universal modelo µQuant (*Bio-tek Instruments*, EUA). Para a curva padrão, utilizamos as seguintes concentrações: 0 pg/ ml; 29,68 pg/ ml; 59,37 pg/ ml; 118,7 pg/ ml; 237,5 pg/ ml; 475 pg/ ml e 950 pg/ ml. Os resultados foram expressos em pg/ ml e o coeficiente de variação foi de 0,86% a 5,56%.

#### 4.9 Dosagem da insulina plasmática

Após 12 horas de jejum, anestesiámos os animais com Avertin e coletamos o sangue através de punção cardíaca. Posteriormente o sangue foi centrifugado a 3.000 G durante 15 minutos. Os plasmas dos animais das ninhadas reduzidas e controle de 120 dias foram coletados e aliqüotados em *ependorfs* que foram mantidos a -20° C para quantificação da insulina determinada através do método de radioimunoensaio utilizando-se “kit” comercial (*MP Biomedicals®*, Europa).

Amostras de 100 µl foram pipetadas em tubo de ensaio recoberto com anticorpo anti-insulina e acrescidos de 900 µl de insulina <sup>125</sup>I reconstituída com tampão fosfato. Após agitação e repouso de 16 horas os tubos de ensaio foram vertidos. Em seguida, foram adicionados aos tubos 4 ml de água destilada e posteriormente os mesmos foram novamente vertidos. Para a curva padrão, utilizamos o mesmo procedimento e as seguintes concentrações: 0 µUI/ ml; 5,5 µUI/ ml; 15 µUI/ ml; 35 µUI/ ml; 70 µUI/ ml; 175 µUI/ ml e 310 µUI/ ml). A leitura do imunocomplexo formado foi realizada em contador modelo Wizard 1470-001 (*Perkinelmer, Burnsville*, EUA). Os resultados foram expressos em µUI/ ml e o coeficiente de variação foi de 3,2% a 12,2%.

#### 4.10 Isolamento das ilhotas pancreáticas e secreção de insulina *in vitro*

Anestesiámos os camundongos *Swiss* machos hiperalimentados e controle de 120 dias com Avertin<sup>7</sup> (0,02 ml/ g de peso) através da via intraperitoneal (Long et al, 2007). Após laparotomia e canulação do ducto hepático comum os pâncreas foram inflados com 3 ml de solução de Hanks (136 mM de cloreto de sódio; 5,36 mM de cloreto de potássio; 0,81 mM de sulfato de magnésio; 0,40 mM de fosfato de sódio dibásico anidro; 0,44 mM de fosfato de potássio monobásico anidro; 1,22 mM de cloreto de cálcio; 0,09 mM de bicarbonato de sódio e 2,8 mM de glicose) acrescida de 20 mg de colagenase tipo I (*Worthington*®, EUA), 20 mg de HEPES e 150 mg de BSA. Posteriormente, os pâncreas foram removidos e acondicionados em banho a 37<sup>o</sup> C por 10 minutos em presença de 5% CO<sub>2</sub> para dissociação das ilhotas pancreáticas (GOTOH et al, 1985).

Com auxílio de microscópio de luz coletámos 120 ilhotas/ pâncreas que foram incubadas a 37<sup>o</sup> C e 5% CO<sub>2</sub> durante os seguintes tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos em solução de Krebs (136 mM de cloreto de sódio; 5 mM de cloreto de potássio; 0,8 mM de sulfato de magnésio; 0,4 mM de fosfato de potássio; 0,2 mM de fosfato de sódio; 1 mM de cloreto de cálcio e 4 mM de bicarbonato de sódio) contendo 2,8 mM de glicose com e sem adição de grelina (no tempo zero minuto) e 16,7 mM de glicose com e sem adição de grelina 10<sup>-12</sup> mM nos demais tempos estudados (DATE et al, 2002), vide figura 5. Ao final da incubação, a solução (ou “meio”) foi coletada e armazenada a -20<sup>o</sup> C para quantificação da insulina e o *pellet* de ilhotas foi guardado em *eppendorfs* que foram mantidos a -70<sup>o</sup> C para a identificação do conteúdo de proteínas específicas relacionadas à secreção de insulina através técnica de *Western Blotting*. A insulina liberada pelas ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados e controle foi determinada através do método de radioimunoensaio. Os resultados foram expressos em µUI/ ml.

---

<sup>7</sup> 0,5 g de tribromoetanol e 310 µl de 2-metil-2-butanol dissolvidos em 40 ml de água destilada.

**PERFUSÃO ESTÁTICA**

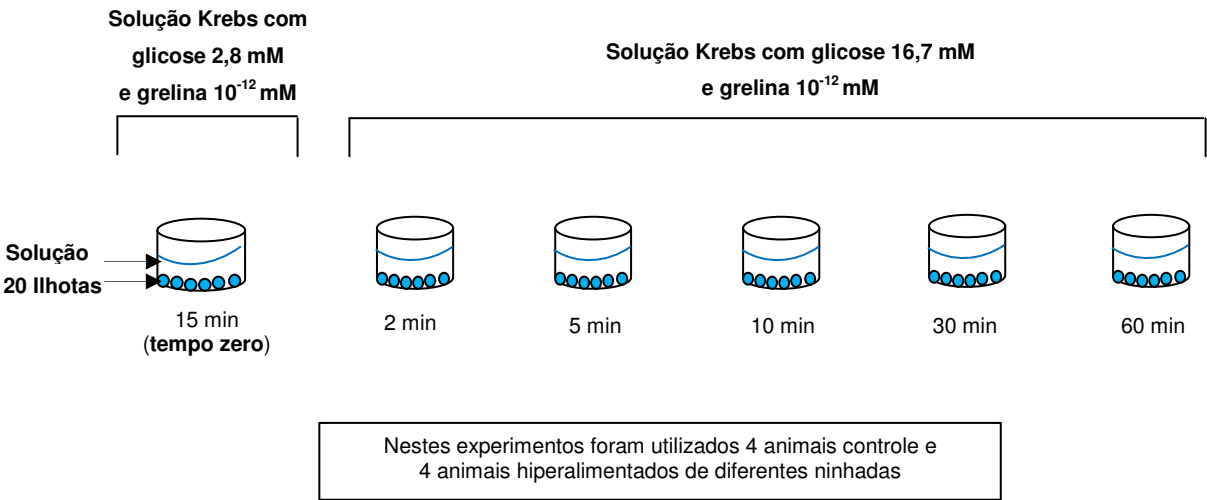
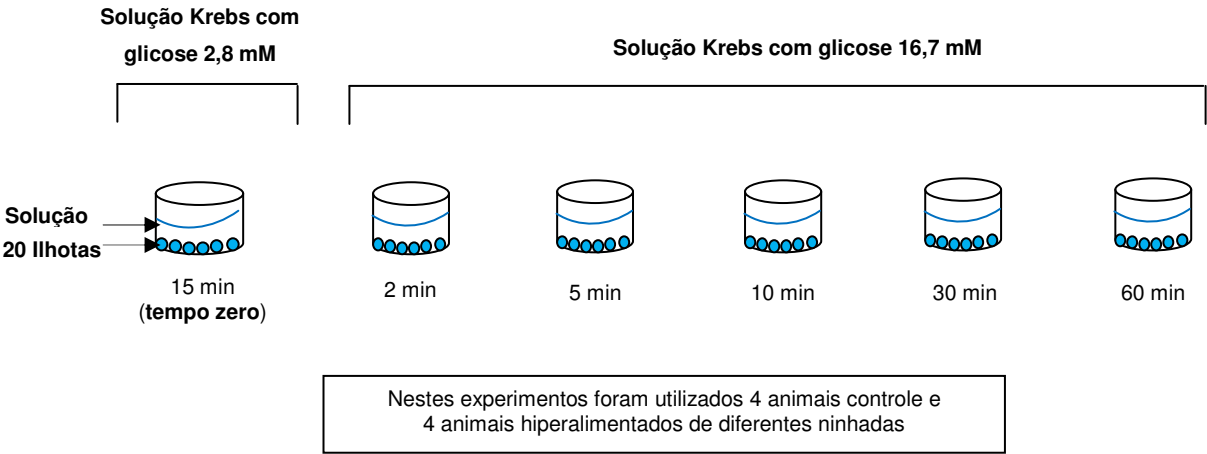


Figura 5: Esquema de incubação das ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados e controle para estudo da secreção de insulina *in vitro*

#### 4.11 Conteúdo de GHSR1A, GLUT2, PAKT, PAMPK e UCP2

Os *pellets* de ilhotas camundongos hiperalimentados e controle foram homogeneizados com solução de lise composta por 50 mM de Hepes, 1 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de EDTA e 1% de TritonX-100 acrescida de inibidores de proteases. Após 1 hora as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados e congelados a  $-20^{\circ}$  C. Posteriormente foi realizada a dosagem das proteínas totais para análise dos conteúdos de GHSR1A, GLUT2, PAKT, PAMPK, UCP2 e Actina pela técnica de *Western Blotting* (THORENS & SARKAR, 1988).

Amostras contendo 15 µg de proteínas foram submetidas aos SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. Posteriormente, foi realizada a transferência para uma membrana de PVDF (*Amersham*®, Inglaterra) por 1 hora utilizando o sistema *Semi-dry* (*Bio-RAD*®, EUA). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% por 1 hora, seguida de incubação *overnight* com anticorpo primário específico diluído (1: 1000). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GLUT2 e anti-Actina de cabra, anti-PAMPK, anti-PAKT e anti-UCP2 de coelho (THORENS & SARKAR, 1988). As membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico diluído (1: 1000) conjugado com biotina durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com estreptavidina diluída (1: 1000) conjugada com peroxidase por 1 hora. As proteínas imunoreativas foram visualizadas através da revelação por quimioluminescência. As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa *Image J Software* (NIH, EUA).

#### 4.12 Análise do consumo de oxigênio pelas ilhotas pancreáticas (Respirometria de alta resolução)

Após isolamento com collagenase, coletamos 100 ilhotas por pâncreas e imediatamente colocamos as mesmas na câmara do oxígrafo, *OROBOROS® Oxygraph-2k* (*Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria*) contendo 2 ml de meio

RPMI<sup>8</sup> acrescido de glicose 2,8 mM a 37<sup>0</sup> C para análise da respiração basal em concentrações de oxigênio superiores a 200 nmol O<sub>2</sub>. ml<sup>-1</sup>. Posteriormente, adicionamos 2 µg/ ml de oligomicina, um inibidor da ATP sintase, permitindo a avaliação do consumo de O<sub>2</sub> desacoplado da produção de ATP (estado 4 da respiração). Calculamos a razão do controle respiratório (RCR) através da razão respiração “máxima” / respiração após adição de oligomicina. Para avaliar o efeito da grelina sobre o consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados e controle, após a análise da respiração basal, adicionamos 10<sup>-12</sup> mM de grelina. Em seguida, acrescentamos 2 µg/ ml de oligomicina para avaliação do estado 4. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de pmols O<sub>2</sub> / s. ilhota<sup>-1</sup>.

#### 4.13 Análise estatística

Apresentamos os resultados como média e desvio padrão. Empregamos ANOVA de medidas repetidas e pós-teste de *Tukey* para avaliar o nível de significância entre as curvas de ganho de peso dos camundongos hiperalimentados e controle.

Adotamos o teste-t de *Student* para ver o nível de significância da distância naso-anal, índice de Lee, percentual de proteína corporal e de gordura corporal, gordura retroperitoneal, glicemia, insulinemia e grelinemia entre os camundongos hiperalimentados e controle.

O teste-t de *Student* também foi usado para calcular o nível de significância da área sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos camundongos controle em presença de glicose sem grelina e de glicose com grelina, bem como dos camundongos hiperalimentados em presença de glicose sem grelina e de glicose com grelina.

Utilizamos ANOVA uma via e pós-teste de *Tukey* para examinar o nível de significância da secreção de insulina *in vitro* e dos conteúdos de GLUT2/ Actina, AKT/ Actina, AMPK/ Actina e UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados e controle nos diferentes tempos estudados, além

---

<sup>8</sup> É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para crescimento celular.

das diferenças no consumo de  $O_2$  pelas ilhotas pancreáticas em presença de glicose, oligomicina e grelina.

Realizamos os testes estatísticos supracitados através do programa *Graph-Pad Prism 5*. Consideramos o valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Seção I: Biometria, glicemia e dosagem hormonal dos animais controle e hiperalimentados

#### 5.1.1 Curva de ganho de peso corporal dos animais hiperalimentados e controle

Através da curva de ganho de peso corporal observamos que os camundongos *Swiss* de ambos os grupos apresentaram aumento de peso até a idade de 120 dias (vide figura 6). Destaca-se que nesta idade os animais hiperalimentados apresentaram um incremento de aproximadamente 20% do peso corporal em relação aos animais controle.

Encontramos diferenças significativas entre o peso corporal dos animais hiperalimentados aos 10 dias ( $8,27 \text{ g} \pm 2,1$ ), 21 dias ( $20,33 \text{ g} \pm 2,3$ ), 30 dias ( $36,06 \text{ g} \pm 1,4$ ), 60 dias ( $52,29 \text{ g} \pm 1,2$ ), 90 dias ( $59,53 \text{ g} \pm 1,0$ ) e 120 dias ( $66,0 \text{ g} \pm 2,3$ ) em comparação ao peso corporal dos animais controle aos 10 dias ( $5,19 \text{ g} \pm 0,6$ ), 21 dias ( $14,12 \text{ g} \pm 2,8$ ), 30 dias ( $25,68 \text{ g} \pm 1,37 \text{ g}$ ), 60 dias ( $40,1 \text{ g} \pm 3,1$ ), 90 dias ( $47,67 \text{ g} \pm 1,1$ ) e 120 dias ( $54,97 \text{ g} \pm 0,9$ ).

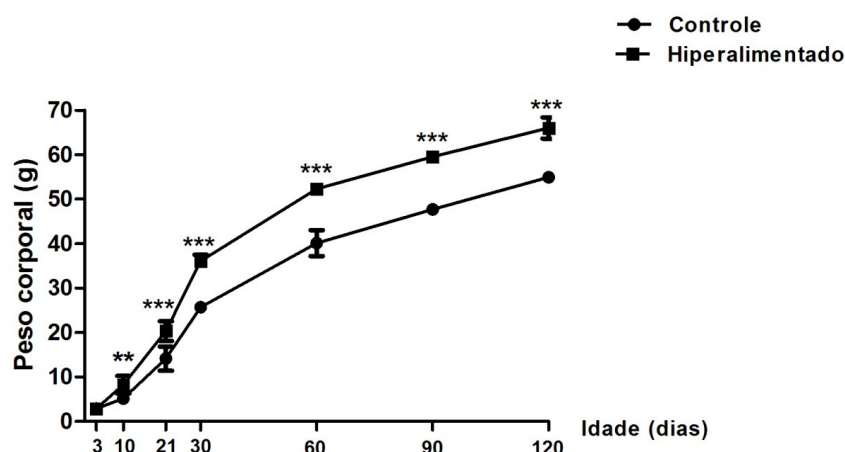


Figura 6: Curva de ganho de peso corporal. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 12 animais) e controle (n= 12 animais), sendo \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001.

### 5.1.2 Distância naso-anal e índice de Lee dos animais hiperalimentados e controle

Os camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram distância naso-anal semelhante ao controle na idade de 120 dias conforme (vide figura 7). Os animais hiperalimentados apresentaram distância naso-anal de  $10,75 \text{ cm} \pm 0,2$  e os animais controle exibiram distância naso-anal de  $10,23 \text{ cm} \pm 0,5$  aos 120 dias de vida.

Em relação ao índice de Lee, os camundongos *Swiss* hiperalimentados mostraram maior índice em comparação ao controle na idade de 120 dias (vide figura 8). Os animais hiperalimentados apresentaram índice de Lee de  $1705,63 \text{ g/mm} \pm 29,3$  e os animais controle exibiram índice de Lee de  $1374,10 \text{ g/mm} \pm 54,9$  na idade adulta.

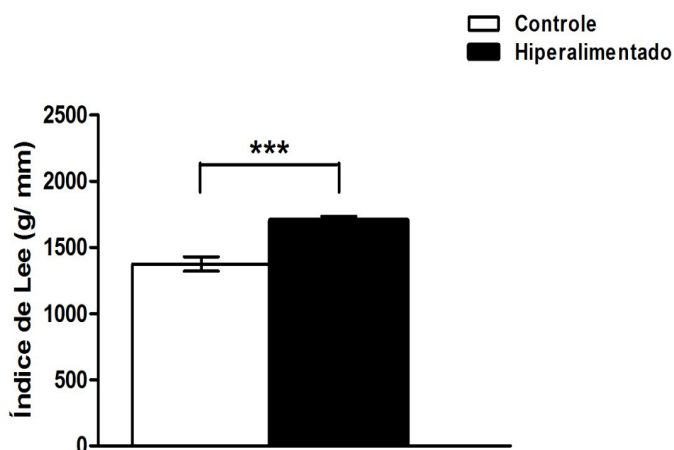


Figura 7: Distância naso-anal. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre a distância naso-anal dos animais hiperalimentados (n= 6 animais) e controle (n= 6 animais), sendo  $p > 0,05$ .

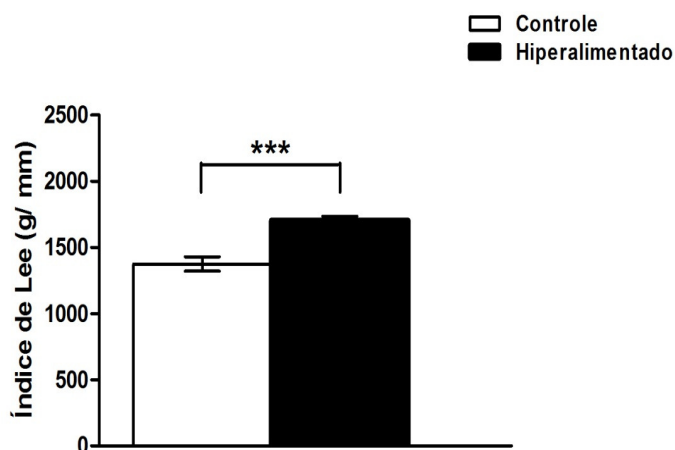


Figura 8: Índice de Lee. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 6 animais) e controle (n= 6 animais), sendo \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.1.3 Massa corporal livre de gordura e gordura corporal total dos animais hiperalimentados e controle

Após a realização de absorciometria de feixe duplo (*DEXA- Dual X-ray Absorptiometry*) em camundongos *Swiss* com 120 dias de vida, constatamos semelhança entre o percentual de massa corporal livre de gordura dos animais hiperalimentados e controle (vide figura 9). A massa corporal livre de gordura foi de 22,83 % nos animais hiperalimentados e de 20,75 %  $\pm$  3,9 nos animais controle aos 120 dias de vida.

Adicionalmente, identificamos expressiva diferença no percentual de gordura corporal total dos animais hiperalimentados em comparação aos animais controle (vide figura 10). Os animais hiperalimentados apresentaram gordura corporal total de 31,0 %  $\pm$  4,6 e os animais controle demonstraram gordura corporal total de 21,5 %  $\pm$  3,6 na idade adulta.

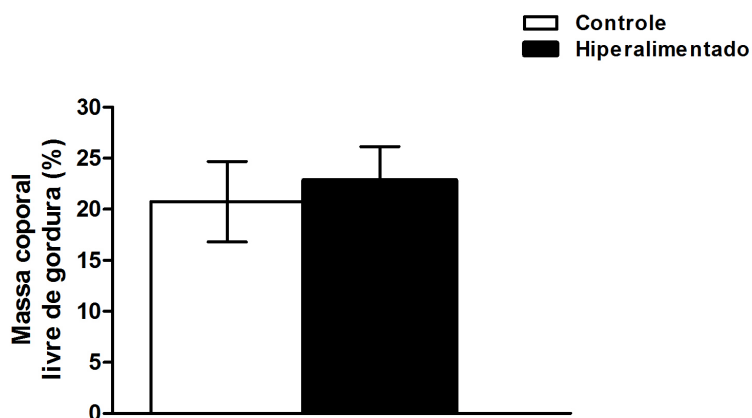


Figura 9: Massa corporal livre de gordura. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre o percentual de massa corporal livre de gordura dos animais hiperalimentados (n= 6 animais) e controle (n= 6 animais), sendo  $p > 0,05$ .

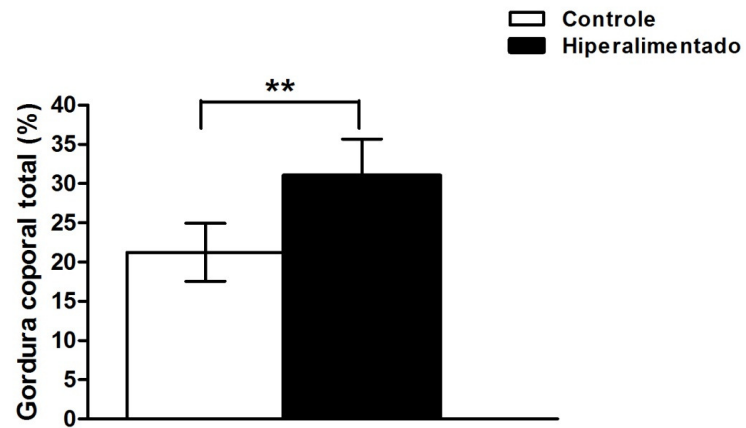


Figura 10: Gordura corporal total. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 6 animais) e controle (n= 6 animais), sendo \*\*p< 0,01.

#### 5.1.4 Gordura retroperitoneal dos animais hiperalimentados e controle

Os camundongos *Swiss* hiperalimentados demonstraram elevação da gordura retroperitoneal em comparação ao controle na idade de 120 dias (vide figura 11). Os animais hiperalimentados apresentaram gordura retroperitoneal de  $0,79 \text{ g} \pm 0,1$  e os animais controle exibiram gordura retroperitoneal de  $0,44 \text{ g} \pm 0,1$  aos 120 dias de idade.

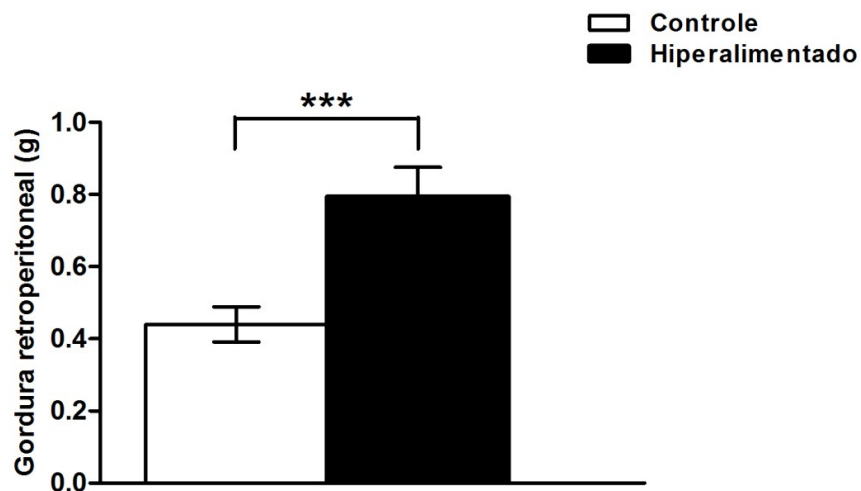


Figura 11: Gordura retroperitoneal. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados ( $n= 6$  animais) e controle ( $n= 6$  animais), sendo \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.1.5 Glicemia e insulinemia de jejum dos animais hiperalimentados e controle

Os camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram-se hiperglicêmicos em relação ao controle na idade de 120 dias (vide figura 12). Os animais hiperalimentados apresentaram glicemia de jejum igual a  $151,83 \text{ mg/dl} \pm 8,3$ ; enquanto os animais controle exibiram glicemia de jejum de  $118,0 \text{ mg/dl} \pm 1,0$  aos 120 dias de vida.

Acrescenta-se que os camundongos hiperalimentados apresentaram-se hiperinsulinêmicos em relação aos camundongos controle aos 120 dias (vide figura 13). Os animais hiperalimentados apresentaram insulinemia de jejum igual a  $54,06 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 2,3$ ; enquanto os animais controle exibiram insulinemia de jejum de  $19,28 \text{ } \mu\text{UI/ml} \pm 1,53$  na idade adulta.

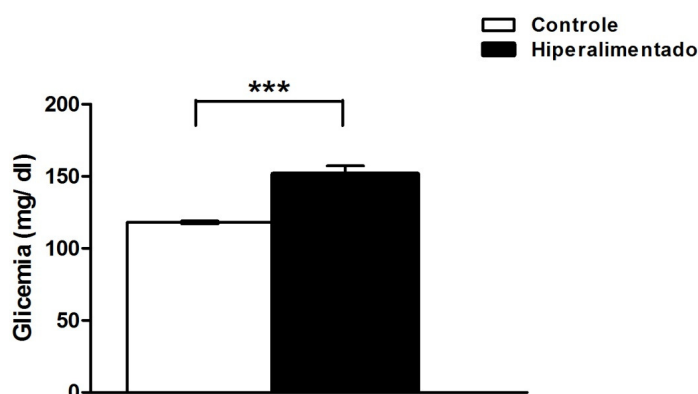


Figura 12: Glicemia de jejum. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 4 animais) e controle (n= 4 animais), sendo \*\*\*p< 0,001.

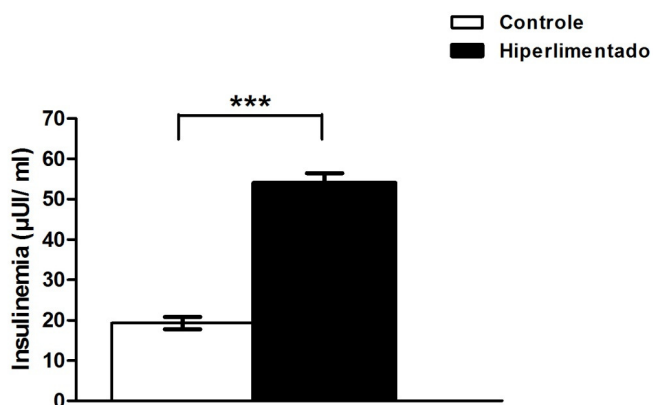


Figura 13: Insulinemia de jejum. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 4 animais) e controle (n= 4 animais), sendo \*\*\*p< 0,001.

#### 5.1.6 Grelinemia de jejum dos animais hiperalimentados e controle

Os camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram-se hipogrelinélicos em relação ao controle aos 120 dias de vida (vide figura 14). Os animais hiperalimentados apresentaram grelinemia de jejum igual a  $98,64 \text{ pg/ml} \pm 56,5$ ; enquanto os animais controle exibiram grelinemia de jejum de  $201,14 \text{ pg/ml} \pm 46,4$  aos 120 dias.

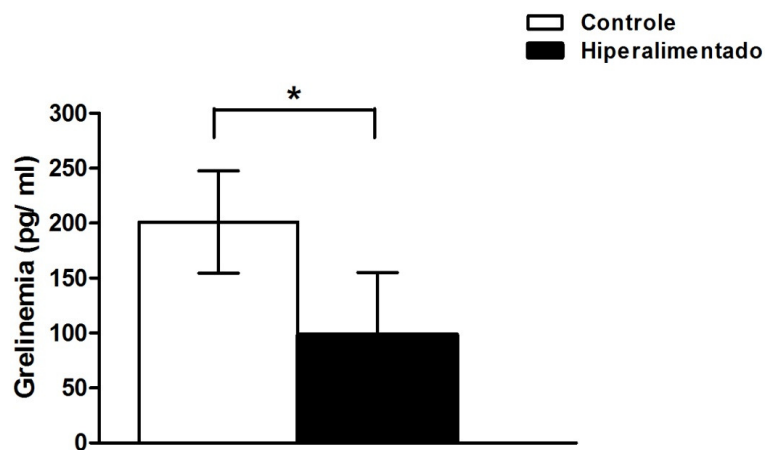


Figura 14: Grelinemia de jejum. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais hiperalimentados (n= 5 animais) e controle (n= 5 animais), sendo  $*p < 0,05$ .

Para fins didáticos os resultados referentes à secreção de insulina *in vitro* e aos conteúdos de GHSR1A/ Actina, GLUT2/ Actina, PAMPK/ Actina e PAKT/ Actina foram compartimentalizados e serão apresentados da seguinte forma:

- 1º nos animais controle em presença de glicose + grelina (Seção II).
- 2º nos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose (Seção III). Esta seção inclui os dados dos animais controle com glicose da seção II.
- 3º nos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose e grelina (Seção IV). Esta seção inclui os dados das seções II e III.

Semelhantemente, os conteúdos de UCP2/ Actina serão apresentados da seguinte forma:

- 1º nos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose (Seção V, figura 31).
- 2º nos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose + grelina (Seção V, figura 34). A figura 34 inclui os dados da figura 31.



## 5.2 Seção II: Secreção de insulina *in vitro* e conteúdo de proteínas específicas nas ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

### 5.2.1 Secreção de insulina *in vitro* dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Observamos ação estimulatória da grelina acilada na segunda fase da secreção de insulina *in vitro* dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas controle (vide figura 15).

Em presença de glicose com grelina os animais controle exibiram uma secreção de insulina de  $15,08 \mu\text{UI/ml} \pm 0,7$ ;  $57,56 \mu\text{UI/ml} \pm 21,3$ ;  $114,30 \mu\text{UI/ml} \pm 15,9$ ;  $89,74 \mu\text{UI/ml} \pm 16,4$ ;  $208,50 \mu\text{UI/ml} \pm 40,85$  e  $41,68 \mu\text{UI/ml} \pm 4,3$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Todavia, na ausência de grelina estes animais apresentaram uma secreção de insulina de  $11,75 \mu\text{UI/ml} \pm 1,5$ ;  $52,08 \mu\text{UI/ml} \pm 1,5$ ;  $60,94 \mu\text{UI/ml} \pm 10,1$ ;  $86,90 \mu\text{UI/ml} \pm 9,5$ ;  $74,31 \mu\text{UI/ml} \pm 7,7$  e  $27,45 \mu\text{UI/ml} \pm 6,1$ , respectivamente nos tempos supracitados.

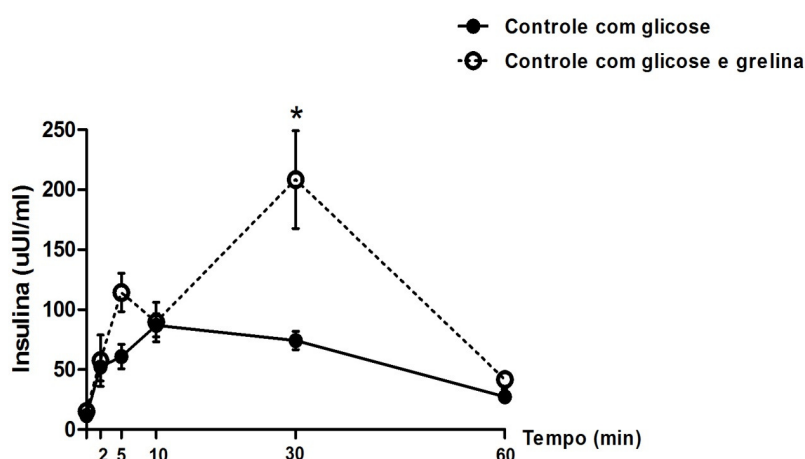


Figura 15: Secreção de insulina *in vitro* dos camundongos controle. As ilhotas pancreáticas dos animais controle foram incubadas em solução de Krebs contendo glicose basal com e sem grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória com e sem grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 animais) e os animais controle com glicose  $\pm$  acrescida de grelina (n= 4 animais), sendo \*p< 0,05.

Identificamos semelhança no conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas das ninhadas controle em presença de glicose com e sem grelina acilada (vide figura 16). Porém, através da análise das áreas sobre as curvas (mostrada na figura 17) verificamos tendência à elevação do GHSR1A/ Actina em presença de glicose com grelina. Em presença de glicose com grelina os animais controle exibiram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de  $1,07 \% \pm 0,1$ ;  $1,68 \% \pm 0,7$ ;  $1,44 \% \pm 0,5$ ;  $1,54 \% \pm 0,8$ ;  $1,59 \% \pm 1,0$  e  $2,96 \% \pm 2,6$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina os animais controle apresentaram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de  $0,82 \% \pm 0,2$ ;  $1,34 \% \pm 0,7$ ;  $1,22 \% \pm 0,3$ ;  $1,20 \% \pm 0,2$ ;  $0,95 \% \pm 0,1$  e  $1,18 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos supracitados.

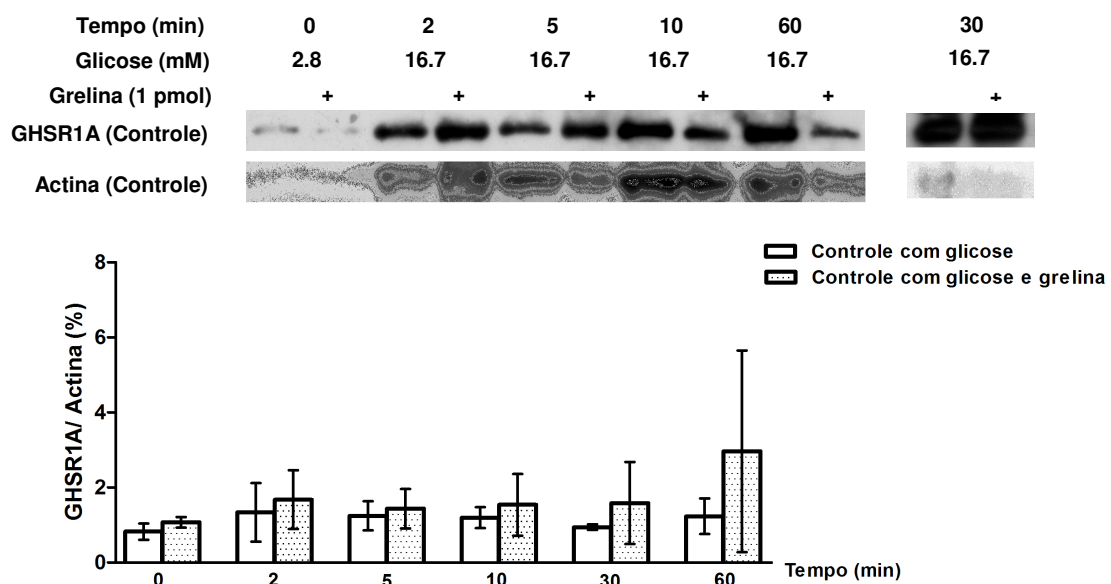


Figura 16: Conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal com e sem grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória com e sem grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 animais) e os animais controle com glicose acrescida de grelina (n= 4 animais), sendo  $p > 0,05$ .

### 5.2.3 Área sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Destacadamente, através da análise das áreas sobre as curvas tornou-se evidente a tendência ( $p= 0,057$ ) à elevação do conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas controle em presença de glicose com grelina acilada ao longo do tempo estudado (vide figura 17). Tais animais apresentaram uma área total sobre a curva de  $121,70 \pm 35,7$  ao final de 60 minutos. Na ausência de grelina os animais controle exibiram uma área total sobre a curva de  $66,48 \pm 12,1$  no tempo supracitado.

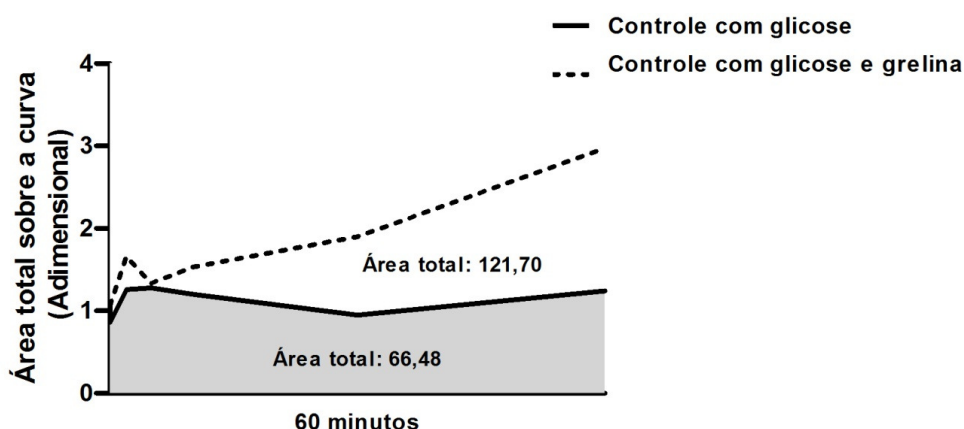


Figura 17: Área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Os valores foram expressos como média. Ressalta-se que as áreas sobre as curvas dos animais controle com glicose ( $n= 4$  animais) e dos animais controle com glicose acrescida de grelina ( $n= 4$  animais) tendem a ser diferentes, sendo  $p= 0,057$ .

#### 5.2.4 Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Verificamos comportamento semelhante do conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas controle em presença de glicose com e sem grelina acilada (vide figura 18). Estes animais apresentaram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $0,66 \% \pm 0,1$ ;  $1,15 \% \pm 0,4$ ;  $0,53 \% \pm 0,1$ ;  $0,57 \% \pm 0,2$ ;  $0,61 \% \pm 0,1$  e  $1,13 \% \pm 0,2$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina os animais controle apresentaram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $0,78 \% \pm 0,3$ ;  $0,93 \% \pm 0,1$ ;  $1,03 \% \pm 0,2$ ;  $0,57 \% \pm 0,2$ ;  $0,8 \% \pm 0,3$  e  $1,07 \% \pm 0,8$ , respectivamente nos tempos supracitados.

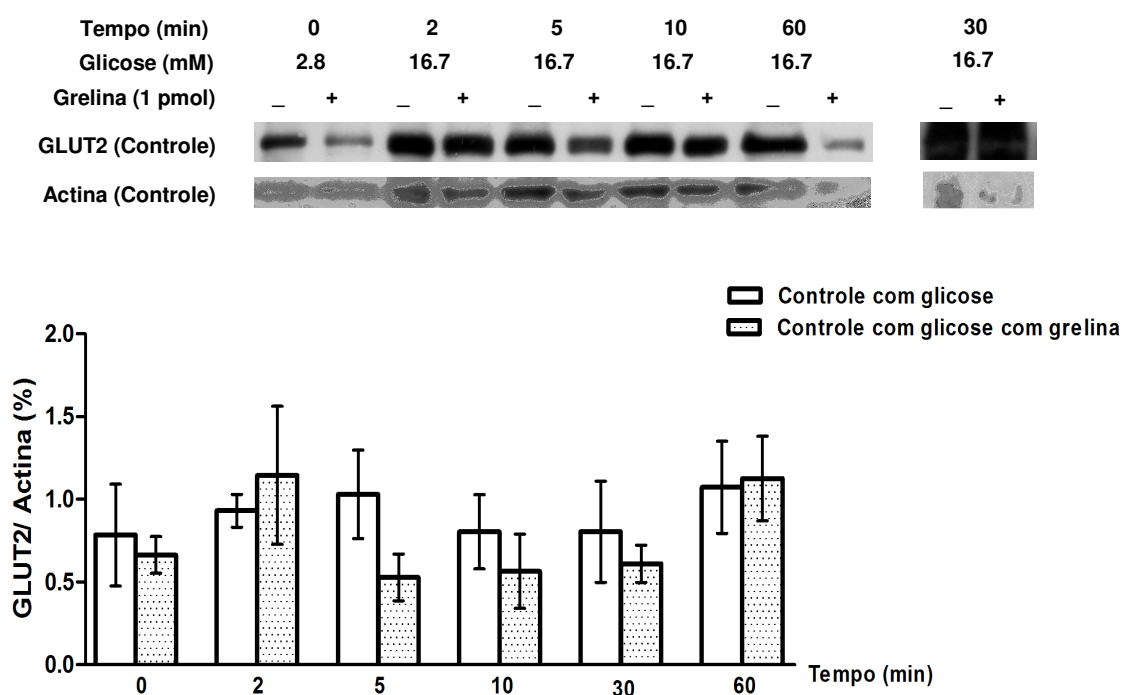


Figura 18: Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal com e sem grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória com e sem grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 animais) e os animais controle com glicose acrescida de grelina (n= 4 animais), sendo  $p > 0,05$ .

### 5.2.5 Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Encontramos diferenças significativas intra-grupo no conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas controle em presença de glicose sem e com grelina acilada (vide figura 19). Os mesmos mostraram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $0,68 \% \pm 0,3$ ;  $1,38 \% \pm 0,1$ ;  $0,81 \% \pm 0,2$ ;  $0,54 \% \pm 0,2$ ;  $1,32 \% \pm 0,4$  e  $0,91 \% \pm 0,2$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Adicionalmente, na ausência de grelina os animais controle apresentaram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $0,95 \% \pm 0,2$ ;  $2,22 \% \pm 0,6$ ;  $1,03 \% \pm 0,2$ ;  $0,81 \% \pm 0,2$ ;  $0,94 \% \pm 0,1$ ;  $1,15 \% \pm 0,3$ , respectivamente nos tempos supracitados.

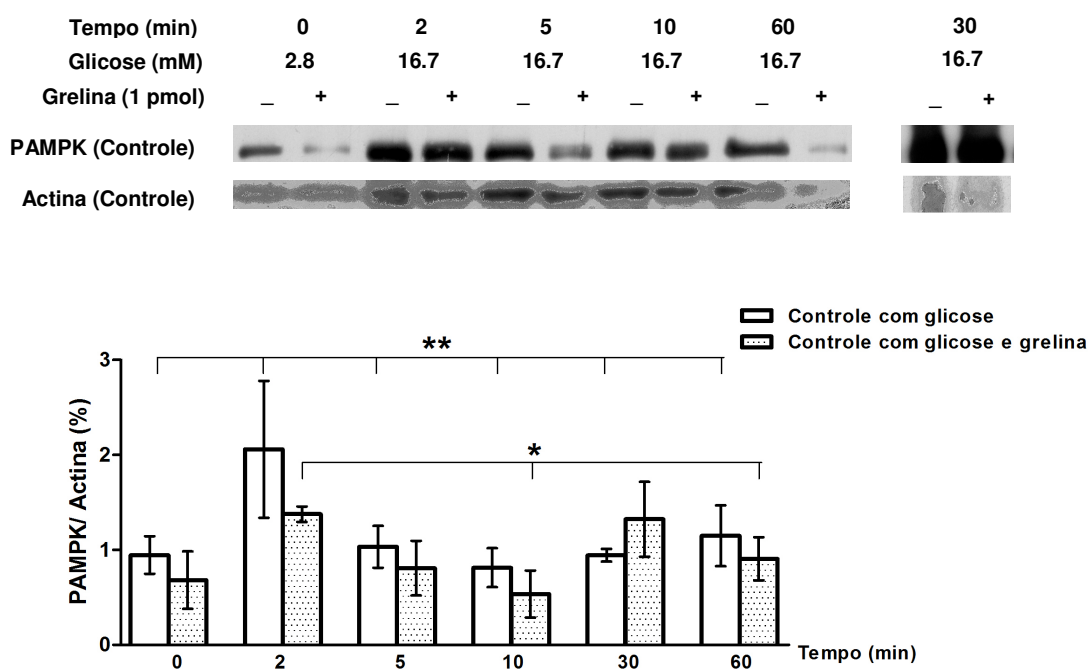


Figura 19: Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal com e sem grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória com e sem grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo controle com glicose (n= 4 animais) e controle com glicose acrescida de grelina (n= 4 animais), sendo \*p< 0,05 e \*\*p< 0,01.

### 5.2.6 Conteúdo de PAKT/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Apontamos comportamento semelhante do conteúdo de PAKT/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas controle em presença de glicose com e sem grelina acilada (vide figura 20). Estes animais apresentaram um conteúdo de PAKT/ Actina de  $0,69 \% \pm 0,2$ ;  $1,04 \% \pm 0,4$ ;  $1,12 \% \pm 0,3$ ;  $0,71 \% \pm 0,3$ ;  $1,26 \% \pm 0,5$  e  $0,86 \% \pm 0,1$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina os animais controle apresentaram um conteúdo de PAKT/ Actina de  $0,95 \% \pm 0,2$ ;  $1,11 \% \pm 0,1$ ;  $1,14 \% \pm 0,2$ ;  $0,97 \% \pm 0,1$ ;  $0,88 \% \pm 0,2$  e  $1,20 \% \pm 0,1$ , respectivamente nos tempos supracitados.

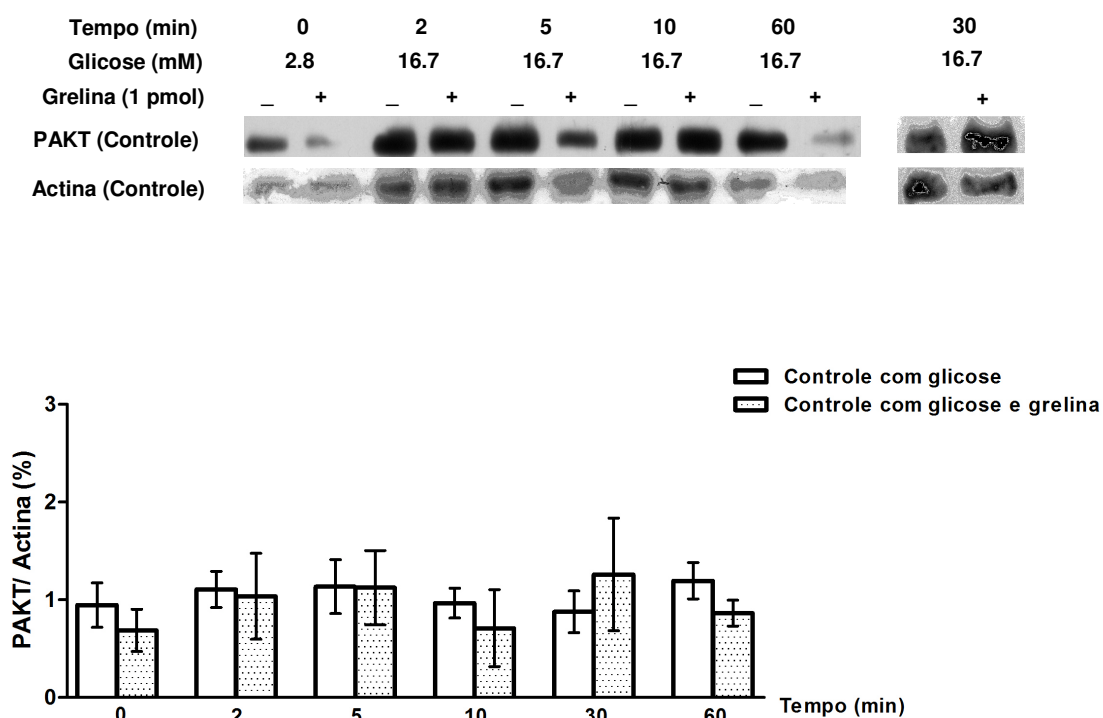


Figura 20: Conteúdo de PAKT/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal com e sem grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória com e sem grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 animais) e os animais controle com glicose acrescida de grelina (n= 4 animais), sendo  $p > 0,05$ .

### 5.3 Seção III: Secreção de insulina *in vitro* e conteúdo de proteínas específicas nas ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose

#### 5.3.1 Secreção de insulina *in vitro* dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose

Observamos expressivo aumento da secreção de insulina *in vitro* nos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas hiperalimentadas em comparação as ninhadas controle a partir de 10 minutos em presença de glicose 16,7 mM (vide figura 21).

Sob estímulo da glicose os animais hiperalimentados exibiram uma secreção de insulina de 122,37  $\mu\text{UI/ml} \pm 61,2$ ; 144,91  $\mu\text{UI/ml} \pm 14,5$ ; 198,90  $\mu\text{UI/ml} \pm 27,8$ ; 209,66  $\mu\text{UI/ml} \pm 46,5$ ; 441,88  $\mu\text{UI/ml} \pm 30,2$  e 214,34  $\mu\text{UI/ml} \pm 29,8$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Acrescenta-se que os animais controle apresentaram uma secreção de insulina de 11,75  $\mu\text{UI/ml} \pm 1,5$ ; 52,08  $\mu\text{UI/ml} \pm 1,5$ ; 60,94  $\mu\text{UI/ml} \pm 10,1$ ; 86,90  $\mu\text{UI/ml} \pm 9,5$ ; 74,31  $\mu\text{UI/ml} \pm 7,7$  e 27,45  $\mu\text{UI/ml} \pm 6,1$ , respectivamente nos tempos supracitados.

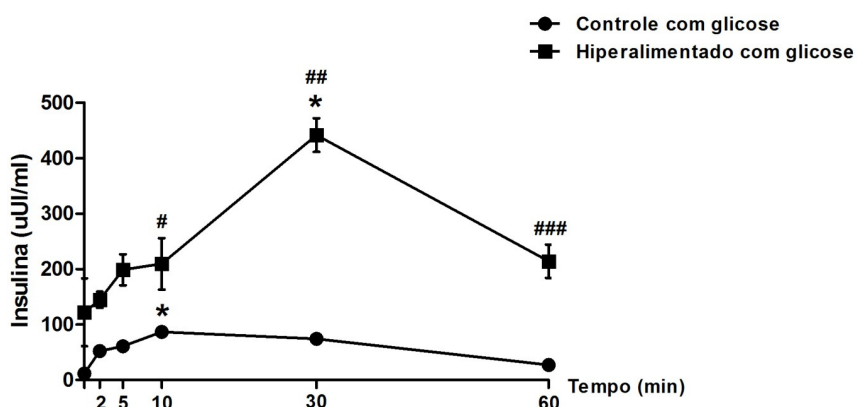


Figura 21: Secreção de insulina *in vitro* dos camundongos hiperalimentados e controle. As ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados foram incubadas em solução de Krebs contendo glicose basal (zero minuto) e glicose estimulatória aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo controle (n= 4 animais) e intra-grupo hiperalimentado (n= 4 animais), sendo \*p< 0,05. Diferença significativa entre os animais controle e hiperalimentados, sendo #p< 0,05, ##p< 0,01 e ###p< 0,001.

### 5.3.2. Conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose

Identificamos elevação do conteúdo de GHSR1A/ Actina nos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas hiperalimentadas em comparação as ninhadas controle aos 30 minutos em presença de glicose 16,7mM (vide figura 22).

Em presença de glicose os animais hiperalimentados exibiram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de 0,91 %  $\pm$  0,3; 1,50 %  $\pm$  0,1; 0,84 %  $\pm$  0,1; 1,01 %  $\pm$  0,02; 3,05 %  $\pm$  2,13 e 1,47 %  $\pm$  0,4, respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Com relação aos animais controle, os mesmos apresentaram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de 0,82 %  $\pm$  0,2; 1,34 %  $\pm$  0,7; 1,22 %  $\pm$  0,3; 1,20 %  $\pm$  0,2; 0,95 %  $\pm$  0,1 e 1,18 %  $\pm$  0,4, respectivamente nos tempos supracitados

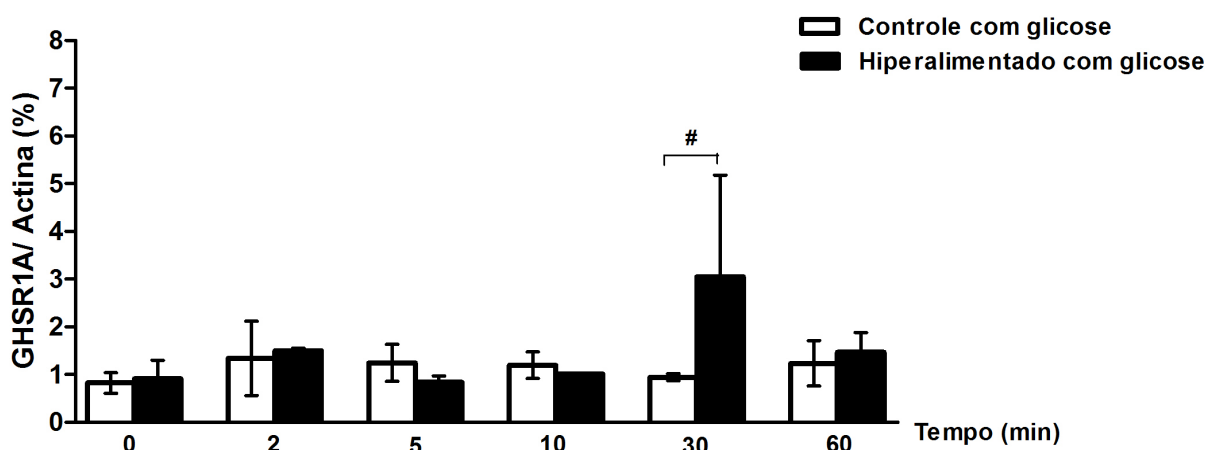


Figura 22: Conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal (zero minuto) e glicose estimulatória aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais controle (n= 4 animais) e hiperalimentados (n= 4 animais), sendo #p< 0,05. **As bandas de GHSR1A e de Actina serão demonstradas na seção IV.**



### 5.3.3. Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose

Verificamos comportamento semelhante do conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas nos camundongos Swiss adultos das ninhadas hiperalimentadas em comparação às ninhadas controle em presença de glicose (vide figura 23).

Os animais hiperalimentados apresentaram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $1,09 \% \pm 0,5$ ;  $1,22 \% \pm 0,3$ ;  $0,85 \% \pm 0,4$ ;  $0,72 \% \pm 0,3$ ;  $0,85 \% \pm 0,5$  e  $0,82 \% \pm 0,5$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Em adição, os animais controle apresentaram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $0,78 \% \pm 0,3$ ;  $0,93 \% \pm 0,1$ ;  $1,03 \% \pm 0,2$ ;  $0,57 \% \pm 0,2$ ;  $0,8 \% \pm 0,3$  e  $1,07 \% \pm 0,8$ , respectivamente nos tempos supracitados.

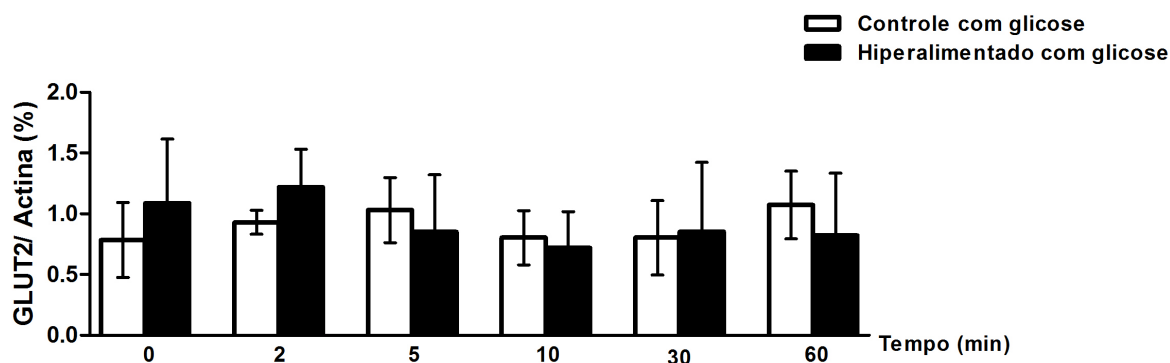


Figura 23: Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal (zero minuto) e glicose estimulatória aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Não encontramos diferença significativa entre os animais controle (n= 4 animais) e hiperalimentados (n= 4 animais), sendo  $p > 0,05$ . As bandas de GLUT2 e de Actina serão demonstradas na seção IV.

#### 5.3.4. Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose

Encontramos diferenças significativas intra-grupo no conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas hiperalimentadas e controle em presença de glicose (vide figura 24).

Os animais hiperalimentados mostraram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $0,48 \% \pm 2,7$ ;  $1,33 \% \pm 0,4$ ;  $1,46 \% \pm 0,6$ ;  $0,90 \% \pm 0,1$ ;  $0,91 \% \pm 0,3$  e  $1,28 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Enquanto os animais controle apresentaram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $0,95 \% \pm 0,2$ ;  $2,22 \% \pm 0,6$ ;  $1,03 \% \pm 0,2$ ;  $0,81 \% \pm 0,2$ ;  $0,94 \% \pm 0,1$ ;  $1,15 \% \pm 0,3$ , respectivamente nos tempos supracitados.

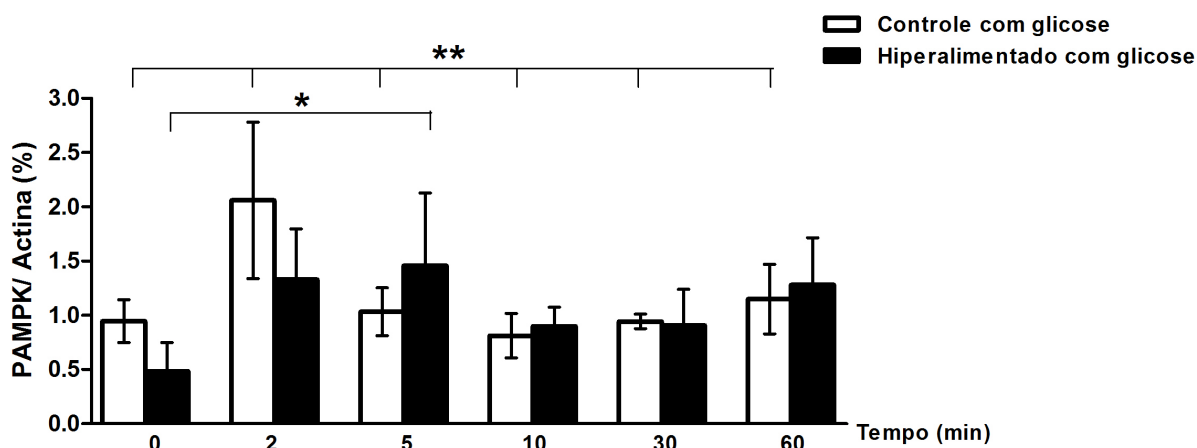


Figura 24: Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle em solução de Krebs contendo glicose basal (zero minuto) e glicose estimulatória aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo controle (n= 4 animais) e intra-grupo hiperalimentado (n= 4 animais), sendo \*p< 0,05 e \*\*p< 0,01. As bandas de PAMPK e de Actina serão demonstradas na seção IV.

#### 5.4.1. Secreção de insulina *in vitro* dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina

Diferentemente dos animais controle que apresentaram aumento significativo da secreção de insulina *in vitro* aos 30 minutos em presença de glicose com grelina em comparação a glicose sem grelina, respectivamente  $208,50 \mu\text{UI/ml} \pm 40,85$  e  $74,31 \mu\text{UI/ml} \pm 7,7$ ; os animais hiperalimentados não mostraram alterações significativas (intra-grupo) na secreção de insulina em nenhum dos tempos estudados (vide figura 25). Em presença de glicose com grelina os hiperalimentados exibiram uma secreção de insulina de  $115,87 \mu\text{UI/ml} \pm 45,58$ ;  $243,76 \mu\text{UI/ml} \pm 25,0$ ;  $179,86 \mu\text{UI/ml} \pm 22,1$ ;  $235,81 \mu\text{UI/ml} \pm 20,3$ ;  $384,96 \mu\text{UI/ml} \pm 33,9$  e  $61,78 \mu\text{UI/ml} \pm 35,6$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina estes animais apresentaram uma secreção de insulina de  $122,37 \mu\text{UI/ml} \pm 61,2$ ;  $144,91 \mu\text{UI/ml} \pm 14,5$ ;  $198,90 \mu\text{UI/ml} \pm 27,8$ ;  $209,66 \mu\text{UI/ml} \pm 46,5$ ;  $441,88 \mu\text{UI/ml} \pm 30,2$  e  $214,34 \mu\text{UI/ml} \pm 29,8$ , respectivamente nos tempos supracitados.

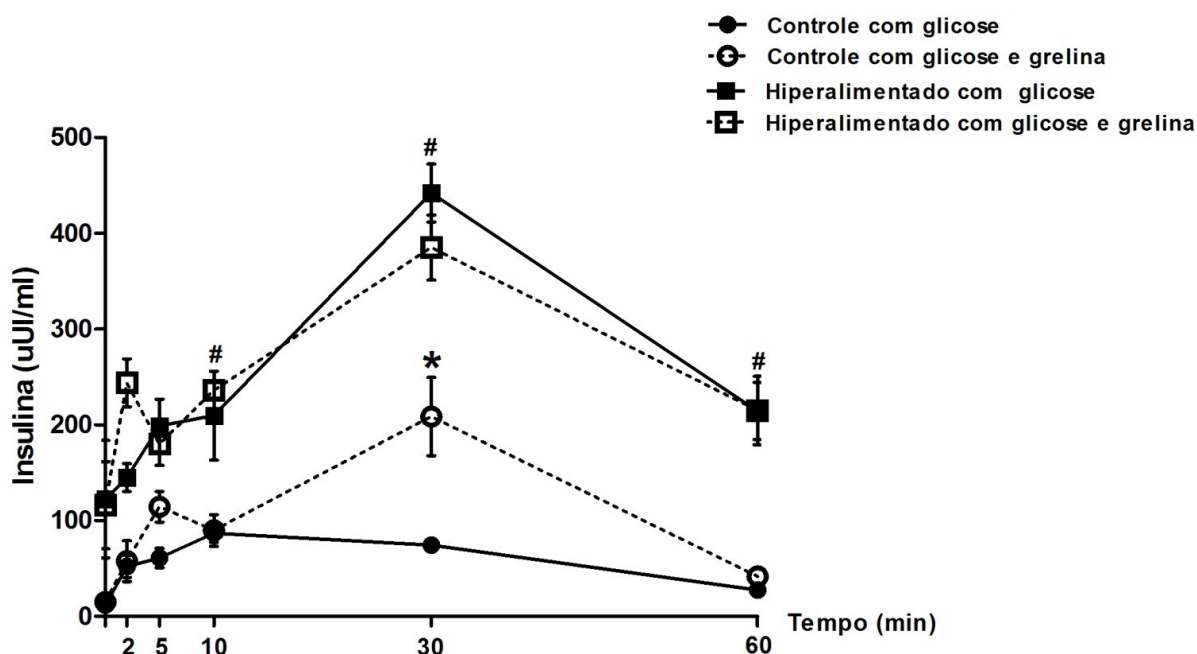


Figura 25: Secreção de insulina *in vitro* dos camundongos hiperalimentados e controle em presença de grelina. As ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados foram incubadas em solução de Krebs contendo glicose basal sem e com grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória sem e com grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo controle ( $n = 4$  animais/ grupo), sendo  $*p < 0,05$ . Diferença significativa entre os grupos controle e hiperalimentado ambos com glicose acrescida ou não de grelina ( $n = 4$  animais/ grupo), sendo  $\#p < 0,05$ .

#### 5.4.2. Conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina

Identificamos semelhança (intra-grupo) no conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais controle (dados descritos anteriormente) e hiperalimentados em presença de glicose com e sem grelina. De igual forma não encontramos diferença significativa entre o conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas do grupo controle com glicose acrescida de grelina e hiperalimentado com glicose acrescida de grelina até 60 minutos (vide figura 26).

Em presença de glicose com grelina acilada os camundongos *Swiss* hiperalimentados exibiram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de  $0,83 \% \pm 0,4$ ;  $1,14 \% \pm 0,6$ ;  $1,63 \% \pm 0,5$ ;  $0,89 \% \pm 0,4$ ;  $1,89 \% \pm 1,5$  e  $1,96 \% \pm 1,2$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina estes animais apresentaram um conteúdo de GHSR1A/ Actina de  $0,91 \% \pm 0,3$ ;  $1,50 \% \pm 0,1$ ;  $0,84 \% \pm 0,1$ ;  $1,02 \% \pm 0,1$ ;  $3,05 \% \pm 2,1$  e  $1,47 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos supracitados.

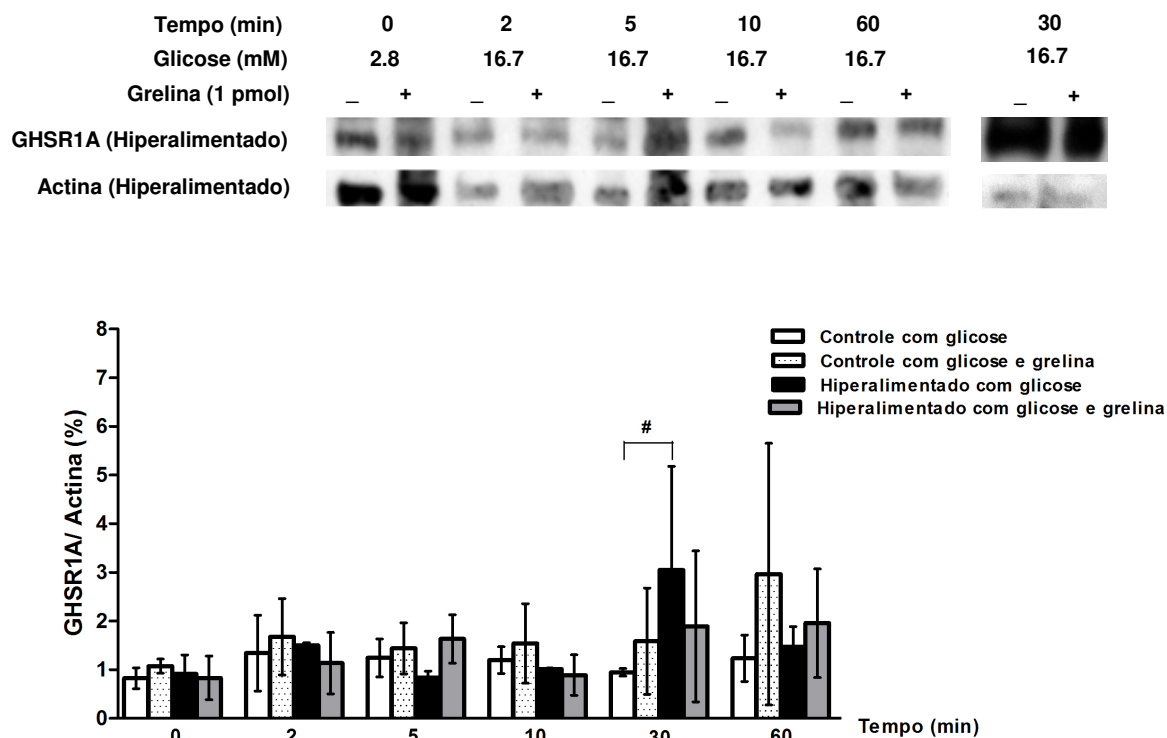


Figura 26: Conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em solução de Krebs contendo glicose basal sem e com grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória sem e com grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 animais) e hiperalimentado com glicose (n= 4 animais), sendo  $^{\#}p < 0,05$ .

#### 5.4.3. Área sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados em presença de glicose mais grelina

Contrariamente aos animais controle que apresentaram tendência à elevação da área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas em presença de glicose com grelina em comparação às ilhotas imersas em glicose sem grelina (dados descritos anteriormente); os animais hiperalimentados não mostraram alterações significativas (intra-grupo) da área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas em presença de glicose com grelina em comparação às ilhotas imersas em glicose sem grelina ao longo do tempo estudado.

Em presença de glicose com grelina acilada, os camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram uma área total sobre a curva de  $119,10 \pm 47,7$  ao final de 60 minutos. Adicionalmente, na ausência de grelina estes animais demonstraram uma área total sobre a curva de  $98,02 \pm 25,4$  no tempo supracitado (vide figura 27).

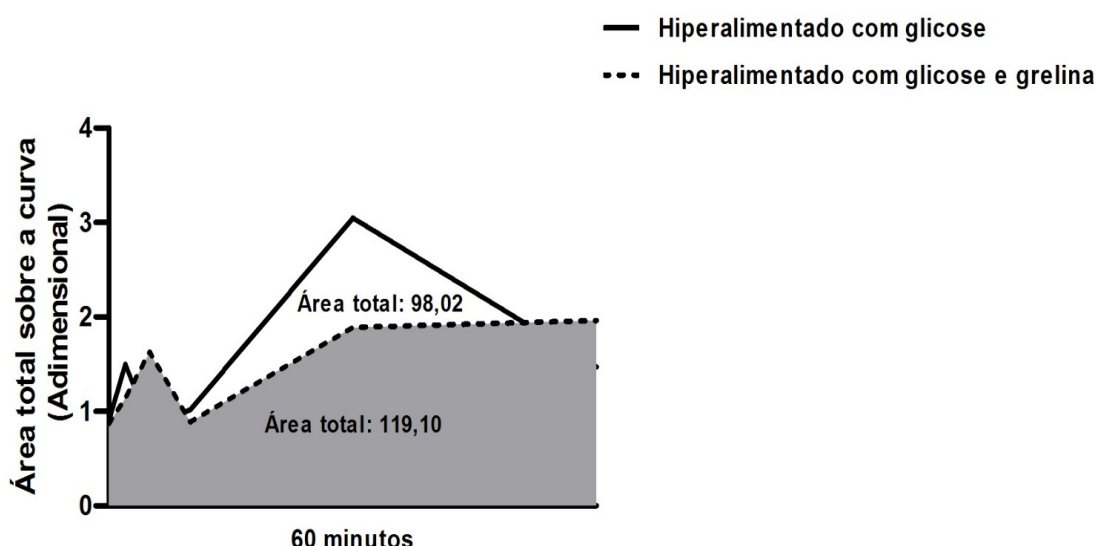


Figura 27: Área total sobre a curva referente ao conteúdo de GHSR1A/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina. Os valores foram expressos como média. As áreas sobre as curvas dos animais hiperalimentados com glicose (n= 24 ninhadas) e dos animais hiperalimentados com glicose acrescida de grelina (n= 24 ninhadas) são semelhantes, sendo  $p > 0,05$ .

#### 5.4.4. Conteúdo de GLUT2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de glicose mais grelina

Detectamos expressivo aumento no conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas do grupo hiperalimentado com glicose e grelina em comparação ao grupo controle com glicose e grelina aos 5 minutos (vide figura 28). Acrescenta-se que também encontramos diferenças significativas entre os conteúdos de GLUT2/ Actina do grupo hiperalimentado com glicose aos 2, 5, 10 e 30 minutos. Além disso, não encontramos diferença significativa entre o grupo hiperalimentado com glicose e hiperalimentado com glicose acrescida de grelina nos tempos estudados.

Em presença de glicose com grelina acilada os camundongos *Swiss* hiperalimentados exibiram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $1,65 \% \pm 0,4$ ;  $0,68 \% \pm 0,4$ ;  $2,07 \% \pm 0,5$ ;  $0,70 \% \pm 0,2$ ;  $0,66 \% \pm 0,1$  e  $1,12 \% \pm 0,21$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina estes animais apresentaram um conteúdo de GLUT2/ Actina de  $1,09 \% \pm 0,5$ ;  $1,22 \% \pm 0,3$ ;  $0,85 \% \pm 0,4$ ;  $0,72 \% \pm 0,3$ ;  $0,85 \% \pm 0,5$  e  $0,82 \% \pm 0,5$ , respectivamente nos tempos supracitados.

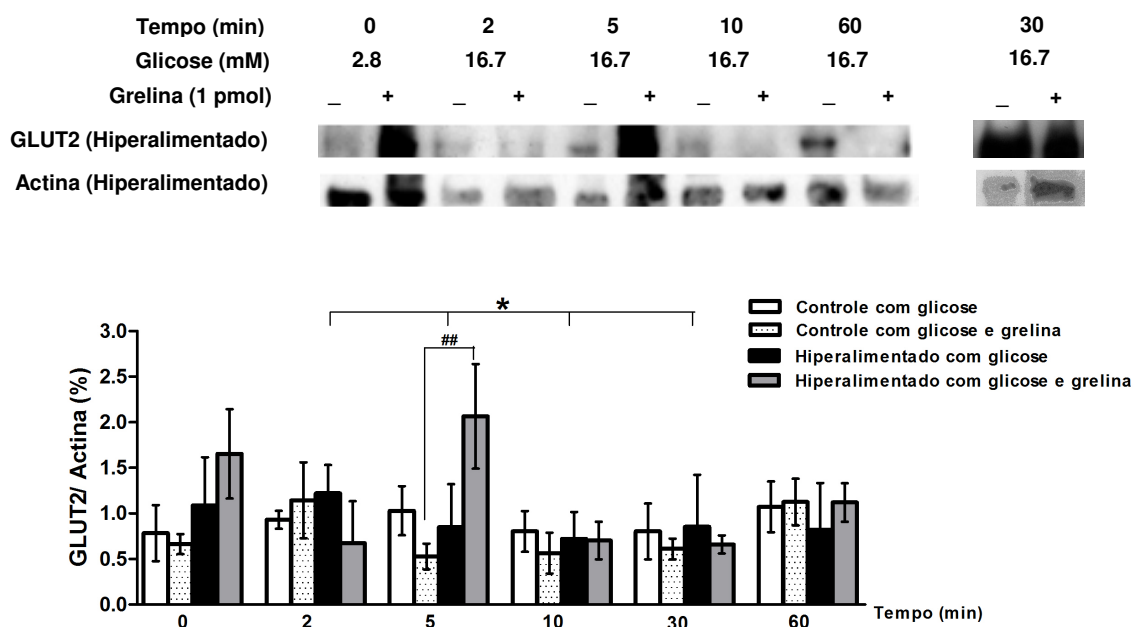


Figura 28: Conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em solução de Krebs contendo glicose basal sem e com grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória sem e com grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo hiperalimentado com glicose (n= 4 animais), sendo  $*p < 0,05$ . Diferença significativa entre o grupo controle e hiperalimentado ambos com glicose acrescida de grelina, considerando 4 animais/grupo, sendo  $##p < 0,01$ .

#### 5.4.5. Conteúdo de PAMPK/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de glicose mais grelina

Encontramos diferenças significativas (intra-grupo) entre os conteúdos de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos Swiss controle e hiperalimentados em presença de glicose (vide figura 29).

Os animais hiperalimentados mostraram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $1,11 \% \pm 1,0$ ;  $1,07 \% \pm 0,1$ ;  $0,79 \% \pm 0,3$ ;  $0,47 \% \pm 0,2$ ;  $0,88 \% \pm 0,2$  e  $1,00 \% \pm 0,1$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Na ausência de grelina estes animais apresentaram um conteúdo de PAMPK/ Actina de  $0,48 \% \pm 2,7$ ;  $1,33 \% \pm 0,4$ ;  $1,46 \% \pm 0,6$ ;  $0,90 \% \pm 0,1$ ;  $0,91 \% \pm 0,3$  e  $1,28 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos supracitados.

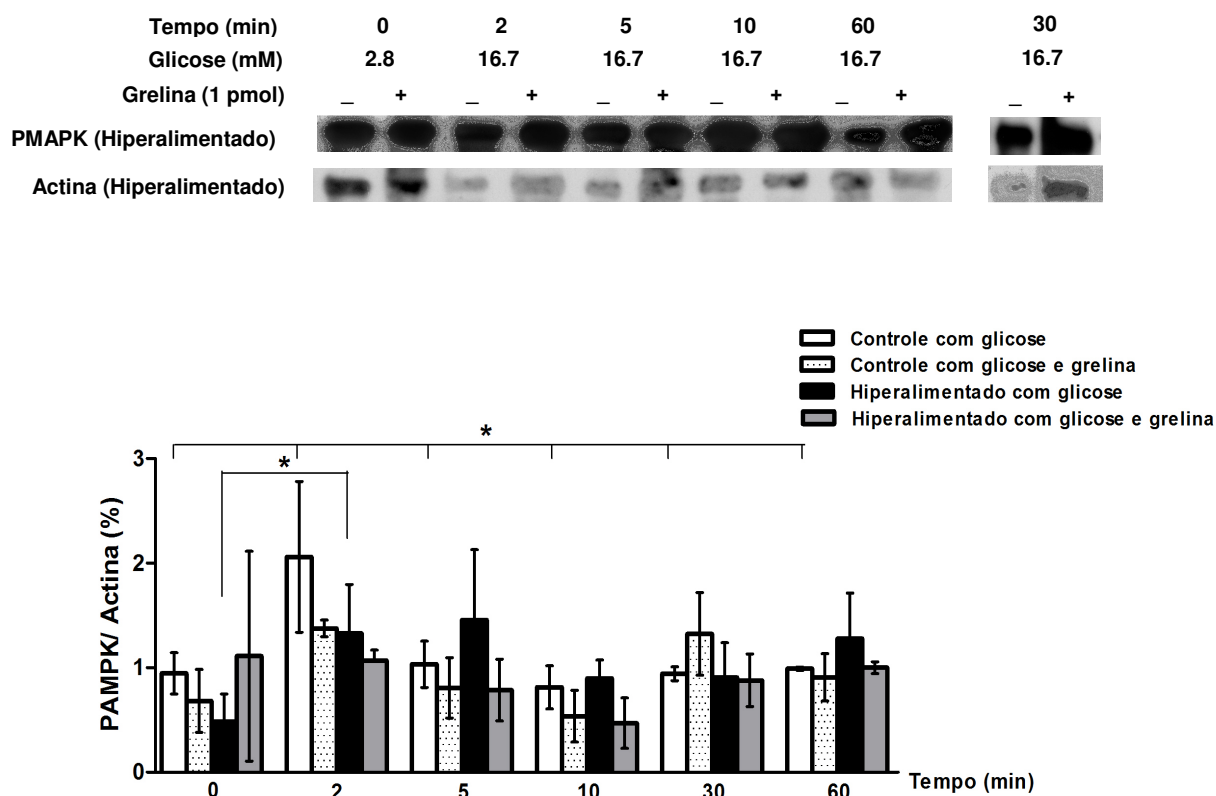


Figura 29: Conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em solução de Krebs contendo glicose basal sem e com grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória sem e com grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa intra-grupo controle (n= 4 animais) e hiperalimentado (n= 4 animais), sendo  $*p < 0,05$ .

### 5.5.1 Consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose e oligomicina

Observamos que em presença de glicose basal (2,8 mM) a respiração das ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* hiperalimentados encontraram-se prejudicada em relação ao controle, respectivamente  $1,76 \text{ pmols O}_2 / \text{s. ilhota}^{-1} \pm 0,8$  e  $4,85 \text{ pmols O}_2 / \text{s. ilhota}^{-1} \pm 1,5$  (vide figura 30). Acrescenta-se que ao contrário das ilhotas pancreáticas dos animais controle que apresentaram queda da respiração em presença de oligomicina – inibidor da ATP sintase ( $2,09 \text{ pmols O}_2 / \text{s. ilhota}^{-1} \pm 0,4$ ), as ilhotas dos hiperalimentados mantiveram sua respiração ( $1,43 \text{ pmols O}_2 / \text{s. ilhota}^{-1} \pm 0,1$ ), sugerindo possível aumento do conteúdo da proteína desacopladora UCP2.

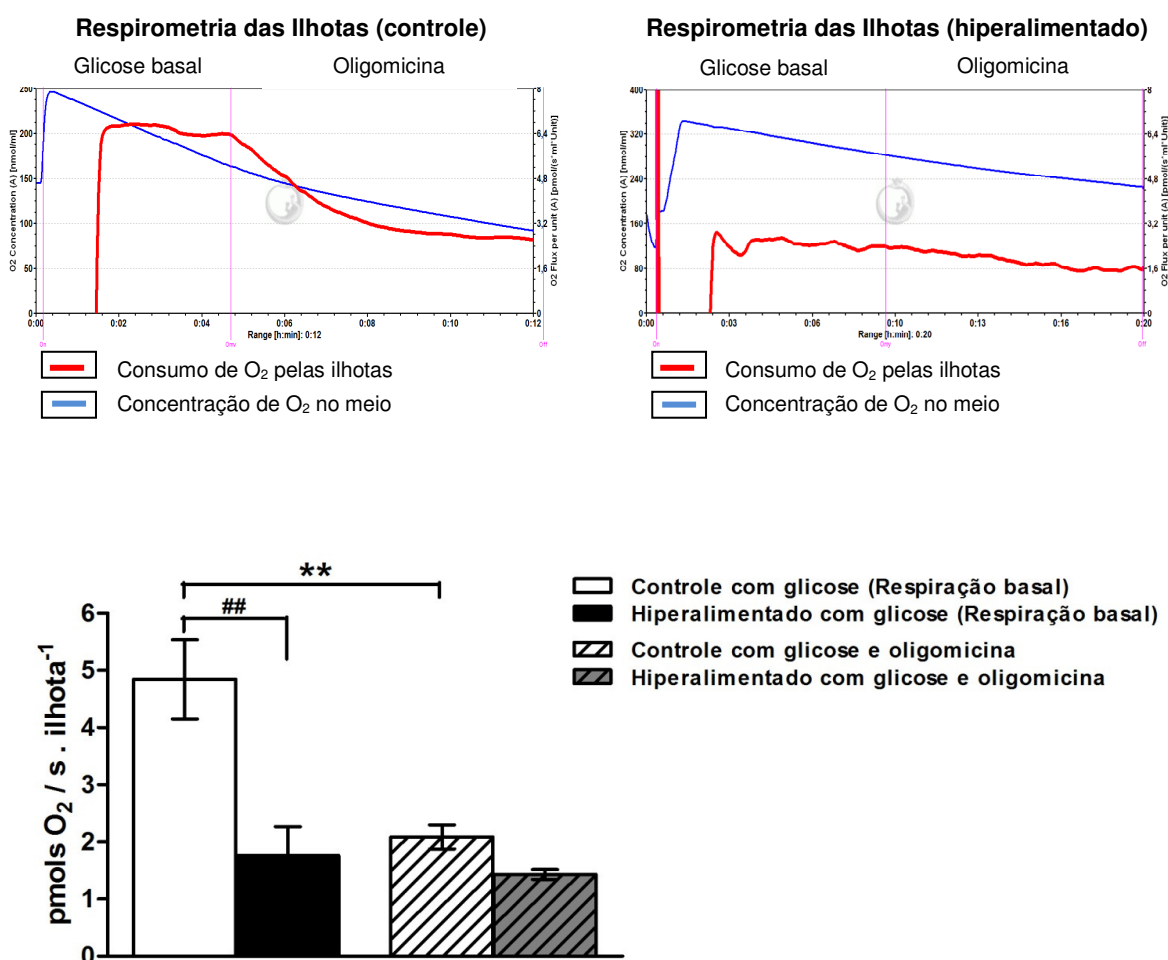


Figura 30: Consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas em presença de glicose e oligomicina. As ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados foram incubadas em RPMI contendo glicose basal posteriormente acrescida de oligomicina. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 ninhadas) e hiperalimentados com glicose (n= 4 ninhadas), sendo #p< 0,01. Diferença significativa entre os animais controle com glicose (n= 4 ninhadas) e controle com glicose e oligomicina (n= 4 ninhadas), sendo \*\*p< 0,01.



### 5.5.2. Conteúdo de UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose

Verificamos comportamento semelhante do conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas nos camundongos *Swiss* adultos das ninhadas hiperalimentadas em comparação as ninhadas controle em presença de glicose (vide figura 31).

Em presença de glicose as ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram um conteúdo de UCP2/ Actina de  $0,71 \% \pm 0,2$ ;  $1,22 \% \pm 0,3$ ;  $1,32 \% \pm 0,1$ ;  $0,90 \% \pm 0,1$ ;  $1,04 \% \pm 0,4$  e  $0,97 \% \pm 0,1$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Em adição, as ilhotas pancreáticas dos camundongos controle apresentaram um conteúdo de UCP2/ Actina de  $0,94 \% \pm 0,3$ ;  $1,59 \% \pm 1,0$ ;  $0,99 \% \pm 0,1$ ;  $1,02 \% \pm 0,1$ ;  $0,77 \% \pm 0,2$  e  $1,31 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos supracitados.

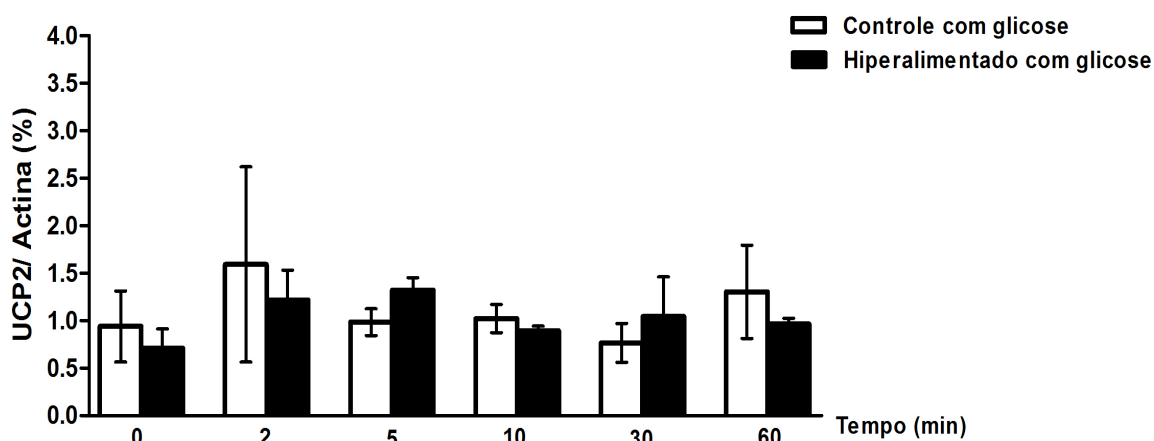


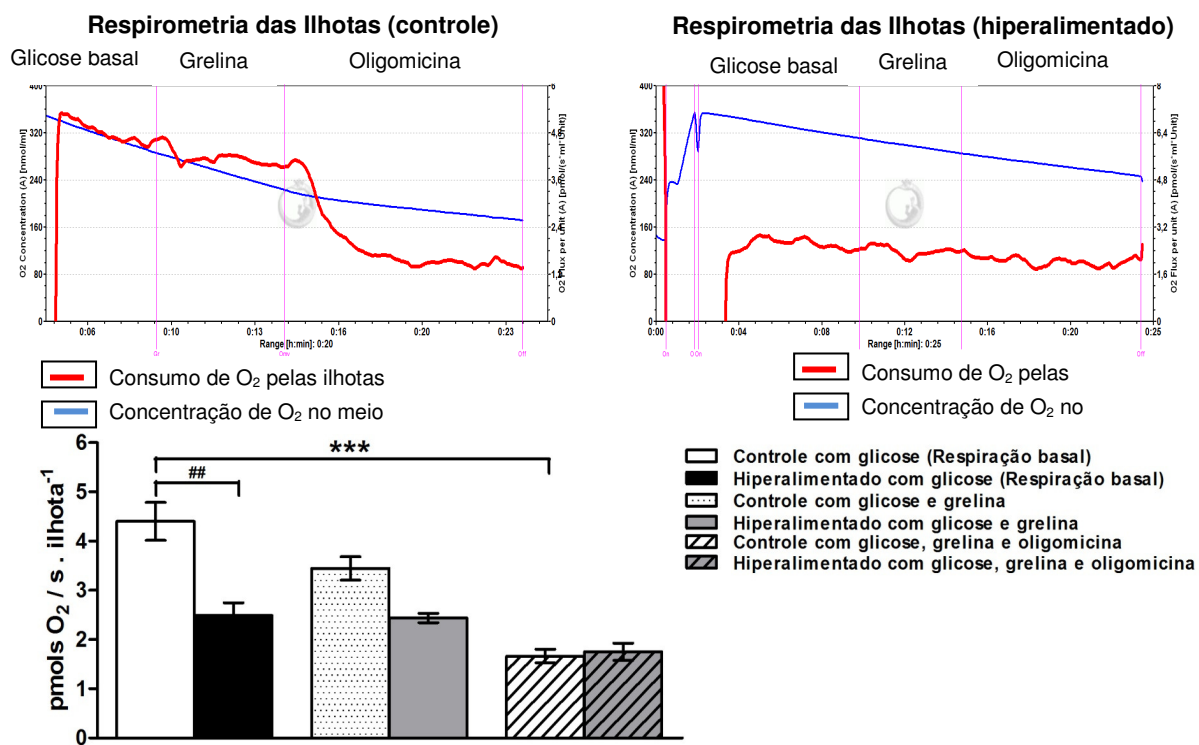
Figura 31: Conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle. Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle (n= 4 animais) e hiperalimentados (n= 4 animais) em solução de Krebs contendo glicose basal (zero minuto) e glicose estimulatória aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As bandas de UCP2 e Actina serão mostradas na figura 34.

### 5.5.3 Consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados em presença de glicose, grelina e oligomicina

Em princípio entendemos que a grelina acilada não atuou de forma significativa na respiração das ilhotas pancreáticas tanto dos animais

hiperalimentados quanto animais controle (vide figura 32), entretanto ao verificarmos a RCR (demonstrada na figura 33) identificamos ação inibitória da grelina acilada na respiração das ilhotas dos camundongos *Swiss* controle.

Observamos que em presença de glicose basal acrescida de grelina acilada a respiração das ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle apresentaram variações não significativas, as mesmas mantiveram-se em respectivamente  $2,43 \pm 0,1$  pmols  $O_2$ / s. ilhota<sup>-1</sup> e  $3,44 \pm 0,4$  pmols  $O_2$ / s. ilhota<sup>-1</sup>. Além disso, confirmamos a queda da respiração das ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de oligomicina ( $1,66 \pm 0,2$  pmols  $O_2$ / s. ilhota<sup>-1</sup>), assim como a manutenção da respiração das ilhotas pancreáticas dos hiperalimentados ( $1,75 \pm 0,3$  pmols  $O_2$ / s. ilhota<sup>-1</sup>) em presença de oligomicina.

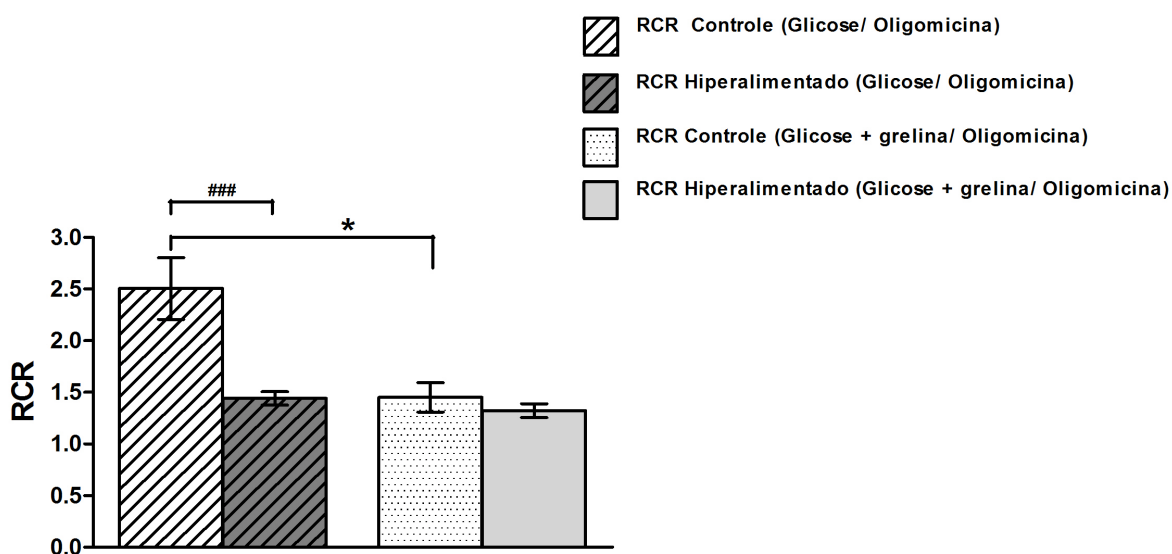


**Figura 32: Consumo de  $O_2$  das ilhotas pancreáticas em presença de glicose, grelina e oligomicina.** As ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados foram incubadas em RPMI contendo glicose basal posteriormente acrescida de grelina acilada e oligomicina. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Animais controle (n= 4) e hiperalimentados (n= 4). ##p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001

#### 5.5.4. Razão do controle respiratório das ilhotas pancreáticas dos animais e controle e hiperalimentados

Através da razão do controle respiratório (RCR), verificamos que a grelina acilada exerceu efeito semelhante ao produzido pela oligomicina na respiração das ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* controle, ou seja, a grelina diminuiu o consumo de O<sub>2</sub> pelas ilhotas controle (vide figura 33). Todavia, tal efeito não foi observado nas ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados.

Na ausência de grelina as ilhotas pancreáticas dos animais controle apresentaram um RCR de  $2,51 \pm 0,7$ . Diante de grelina acilada o RCR destes animais foi de  $1,45 \pm 0,2$ . Adicionalmente, os animais hiperalimentados exibiram na ausência de grelina um RCR de  $1,44 \pm 0,2$ . Quando em presença de grelina acilada os animais hiperalimentados demonstraram um RCR de  $1,32 \pm 0,1$ .

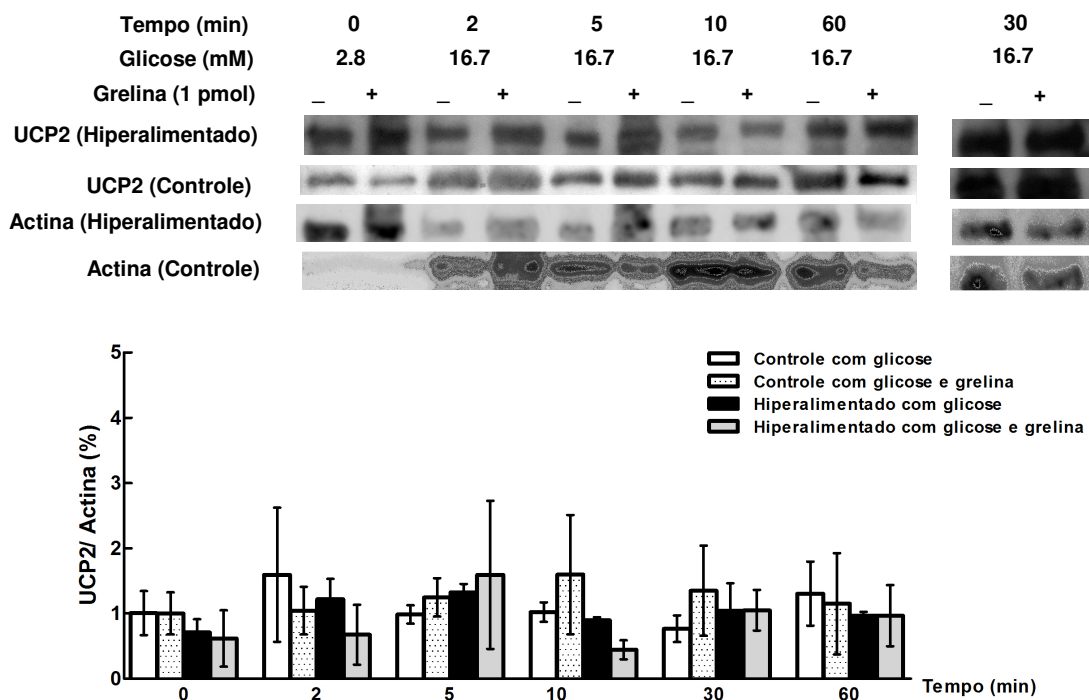


**Figura 33: Razão do controle respiratório das ilhotas pancreáticas (RCR).** As ilhotas pancreáticas dos animais controle e hiperalimentados foram incubadas em RPMI contendo glicose basal posteriormente acrescida de grelina acilada e oligomicina. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Animais controle (n= 4) e hiperalimentados (n= 4), sendo \*p< 0,05 e ###p< 0,001.

### 5.5.5. Conteúdo de UCP2/ Actina das ilhotas pancreáticas dos animais e controle e hiperalimentados em presença de glicose mais grelina

Sabendo-se que a grelina diminuiu a respiração das ilhotas controle, entendemos que deveríamos averiguar o conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* controle e também hiperalimentados em presença de grelina acilada.

Verificamos comportamento semelhante do conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas nos camundongos *Swiss* hiperalimentados em comparação aos camundongos controle em presença de glicose acrescida de grelina (vide figura 34). Em presença de glicose com grelina acilada as ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* hiperalimentados apresentaram um conteúdo de UCP2/ Actina de  $0,62 \% \pm 0,4$ ;  $0,68 \% \pm 0,4$ ;  $1,59 \% \pm 1,1$ ;  $0,44 \% \pm 0,1$ ;  $1,05 \% \pm 0,3$  e  $0,97 \% \pm 0,4$ , respectivamente nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Adicionalmente, as ilhotas pancreáticas dos camundongos controle apresentaram um conteúdo de UCP2/ Actina de  $1,00 \% \pm 0,3$ ;  $1,04 \% \pm 0,3$ ;  $1,25 \% \pm 0,2$ ;  $1,60 \% \pm 0,9$ ;  $1,35 \% \pm 0,6$  e  $1,15 \% \pm 0,7$ , respectivamente nos tempos supracitados.



**Figura 34: Conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados e controle em presença de grelina.** Realizou-se *Western blotting* após incubação das ilhotas pancreáticas dos animais controle (n= 4 animais) e hiperalimentados (n= 4 animais) em solução de Krebs contendo glicose basal sem e com grelina acilada (zero minuto) e glicose estimulatória sem e com grelina acilada aos 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 6 DISCUSSÃO

Os nossos resultados confirmam os relatos encontrados na literatura que demonstram a associação entre as alterações nutricionais no início da vida e seus efeitos prospectivos na idade adulta relacionados ao status nutricional neonatal (WATERLAND & GARZA, 1999). Corroboram também estudos que assinalam a importância da nutrição durante a lactação na determinação específica do processo de Impressão Metabólica (PLAGEMANN et al, 1992 & 1999; MOURA et al, 2002). Desta forma, podemos afirmar que alterações nutricionais no período da lactação devem ser consideradas deletérias e determinantes no estabelecimento de alterações da saúde em longo prazo.

A assertiva acima se justifica pelo amplo conhecimento da importância da lactação. Este processo fisiológico orientado principalmente para o estabelecimento de vias regulatórias que proporcionarão autonomia fisiológica ao organismo em relação ao meio ambiente, uma vez alterado, determina processos adaptativos objetivando a otimização da utilização dos nutrientes em restrição ou em excesso.

O leite materno, como demonstramos (CUNHA et al, 2009), através de seus nutrientes age diretamente no desenvolvimento e na função dos órgãos através da construção e regulação das vias metabólicas celulares. Assim, tais vias podem desenvolver-se normalmente ou sofrer modificações (adaptações) devido a uma condição anômala como a falta ou o excesso de nutrientes na lactação. Por exemplo, estas adaptações frente a um ambiente de plena oferta alimentar no início da vida podem gerar na idade adulta o aparecimento da obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (LUCAS, 1998; WATERLAND & GARZA, 1999; GODFREY & BARKER, 2000). Desta forma, as adaptações necessárias no início da vida podem determinar um custo fisiológico na idade adulta representado pelas doenças anteriormente citadas.

A ação específica dos nutrientes na modulação do comportamento alimentar durante a lactação tem sido muito estudada. Um importante mecanismo sugerido como responsável pela modificação do comportamento alimentar está relacionado à elevação dos hormônios insulina e leptina no período perinatal. Sugere-se que a elevação destes hormônios, neste período específico do desenvolvimento, induz o aumento da galanina, um neuropeptídeo que estimula de forma potente o consumo de alimentos e o ganho de peso corporal (PLAGEMANN et al, 1999). Além disso, a

insulina e a leptina podem interferir no crescimento da rede neural hipotalâmica (PINTO et al, 2004; McMILLEN & ROBINSON, 2005; HORVATH & BRUNING, 2006), modificando permanentemente os centros de fome e saciedade (MOURA et al, 2002) e em consequência o comportamento alimentar.

Tem sido demonstrado que o hormônio gástrico grelina também pode regular o comportamento alimentar. A grelina estimula a fome e inibe a saciedade (GIL-CAMPOS et al, 2006; HOSODA et al, 2002) ao bloquear a ação anorexigênica da insulina e da leptina pela inibição dos receptores MC4 hipotalâmicos (NAKAZATO et al, 2001; HOSODA et al, 2002).

Sabe-se que a grelina acilada interfere de maneira direta na secreção de insulina (Adeghate et al, 2002; Date et al, 2002; Lee et al, 2002; Egido et al, 2002; Broglio et al, 2002; Reimer et al, 2003). Sendo assim, a dinâmica da regulação do comportamento alimentar englobaria não só a ação central da grelina, mas também sua ação periférica. Neste caso, o hormônio grelina apresenta-se como de particular interesse, pois sua atuação no organismo representa a integração de diferentes órgãos, tais como: estômago, hipotálamo e pâncreas (CASTAÑEDA et al, 2010).

Os nossos resultados confirmam o efeito prospectivo do desequilíbrio de nutrientes no início da vida. Constatamos que na fase adulta (120 dias) os animais hiperalimentados atingiram um comprimento naso-anal semelhante ao dos animais controle, entretanto a mesma similaridade não foi observada em relação ao ganho de peso corporal. Os animais hiperalimentados apresentaram aumento do peso corporal de aproximadamente 20% na idade de 120 dias em comparação aos animais controle. Na idade adulta também identificamos nos hiperalimentados maior Índice de Lee, elevação do percentual de gordura corporal total e aumento da gordura retroperitoneal em comparação aos animais controle. Além disso, verificamos semelhante massa corporal livre de gordura entre os animais hiperalimentados e controle aos 120 dias.

Os resultados supracitados demonstram que o aumento de peso corporal apresentado pelos animais hiperalimentados não esteve relacionado ao crescimento longitudinal nem ao percentual de proteína corporal total; o incremento de 20% no peso corporal dos hiperalimentados esteve diretamente associado ao excesso de gordura visceral notadamente da região retroperitoneal na idade adulta. A importância destes dados deve-se ao fato de que os adipócitos do tecido adiposo visceral são muito sensíveis às catecolaminas (MORI et al, 2009; ANTHONY et al,

2009) e portanto, bastante ativos em comparação aos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo. Assim, havendo excesso de gordura visceral acontece intensa lipólise seguida de aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) no plasma (WALTON et al, 1995; GASTALDELLI et al, 2002; GURNELL et al, 2003; GUNGOR et al, 2005). Como consequência, ocorre o estabelecimento de perfil metabólico aterogênico que favorece a doença arterial coronariana (DESPRES et al, 1989), além de resistência à insulina no fígado e no músculo esquelético (POULIOT et al, 1992; ROSS et al, 2002; CNOP et al, 2003; ABATE et al, 1995; MARCUS et al, 1999), hiperinsulinemia (TCHERNOF, 1996) e outros eventos relacionados à sobrevivência das células  $\beta$  pancreáticas tais como a lipoapoptose – morte celular programada induzida pelos lipídeos.

À medida que o tecido adiposo se expande, os adipócitos aumentam sua secreção de leptina (JÉQUIER & TAPPY, 2002). Esta adipocina inibe a síntese de ceramidas<sup>9</sup> (por exemplo, no músculo esquelético e no pâncreas) e estimula a oxidação dos ácidos graxos mantendo-os em nível adequado (ZHANG et al, 1994; SCHERER et al, 1995; MAEDA et al, 1996). Assim, a leptina evita a acumulação ectópica de lipídeos e a lipoapoptose (UNGER, 2003; LANG et al, 2011). Especificamente no pâncreas, a ação antiesteatótica da leptina envolve a inibição da atividade da serina palmitoil transferase – SPT, enzima responsável pela formação de ceramida a partir da condensação de palmitoil-CoA com serina (WEISS et al, 1997). Além disso, a leptina previne a supressão da expressão da proteína antiapoptótica BCL2 em ilhotas pancreáticas expostas a quantidades excessivas de ácidos graxos (SHIMABUKURO et al, 1998).

Nossos resultados confirmam o desenvolvimento de hiperglicemia de jejum acompanhada de hiperinsulinemia nos camundongos *Swiss* adultos hiperalimentados – desequilíbrios que primeiramente podem levar à hipersecreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e em último caso comprometimento da capacidade secretora das mesmas relacionado à degeneração celular.

Destacamos também que as alterações morfofuncionais citadas acima foram observadas em camundongos db/db. Os camundongos db/db são caracterizados pela ausência do receptor de leptina de cadeia longa, hiperfagia, obesidade extrema e desenvolvimento da diabetes mellitus (COLEMAN, 1978; LEIBEL, 1997). Durante a fase inicial da doença (4 a 10 semanas), os camundongos db/db exibiram

---

<sup>9</sup> Esfingolipídio envolvido com a homeostase celular e processos patológicos tais como apoptose e estresse oxidativo.

hiperglicemia, hiperinsulinemia compensatória e resistência periférica à insulina. Na fase tardia (a partir de 12 semanas), estes animais apresentaram diminuição da insulina plasmática relacionada à degeneração das células  $\beta$  pancreáticas e atrofia das ilhotas pancreáticas (MIYAWAKI et al, 2008).

Além de alterações na glicemia e insulinemia, identificamos hipogrelinemia de jejum nos camundongos hiperalimentados em comparação ao controle. Corroborando os nossos dados, um estudo sobre a resposta metabólica ao jejum em camundongos obesos C57BL6 e em camundongos ob/ob<sup>10</sup> identificou elevação menos pronunciada da grelina plasmática nestes animais quando comparados ao controle após jejum de 24 horas (UENO et al, 2007). Também após investigação realizada em indivíduos severamente obesos (IMC=  $44,5 \pm 7,1$  Kg/ m<sup>2</sup>) e em indivíduos não obesos (IMC=  $23,1 \pm 1,3$  Kg/ m<sup>2</sup>) constatou-se hipogrelinemia de jejum e menores níveis de grelina plasmática pós-prandial nos indivíduos obesos em comparação aos não obesos (CARLSON et al, 2009).

Ao estudar o papel da grelina na modulação da adiposidade corporal em modelo experimental de obesidade em camundongos, nosso grupo identificou aumento do conteúdo do receptor da grelina tipo 1A (GHSR1A) no tecido adiposo branco de camundongos *Swiss* hiperalimentados jovens (SOARES et al, 2011). Ainda nestes animais, constatou-se modificação do metabolismo energético do adipócito através da elevação do conteúdo das proteínas GLUT4, PI3K, PAKT, PAMPK e CPT1 em relação aos animais controle aos 21 dias de vida (SOARES et al, 2011).

Nossos estudos também trataram do aumento da sensibilidade à grelina presente no pâncreas, pois como identificamos as ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados adultos apresentaram maior conteúdo de GHSR1A/ Actina em comparação ao controle aos 30 minutos de estimulação com glicose não adicionada de grelina.

A seguir, discutiremos o efeito da grelina acilada no processo de estímulo-secreção de insulina *in vitro*, primeiramente nos camundongos controle.

Sabe-se que após o consumo de alimentos os carboidratos são digeridos e então absorvidos. A grande elevação de glicose (WICKSTEED et al, 2003) e outros produtos da digestão, tais como os aminoácidos (KRAUSE et al, 2011; AMARAL et al, 2010), bem como o GLP-1 (Peptídeo semelhante ao glucagon- 1) e o GIP –

---

<sup>10</sup> Camundongos caracterizados pela deficiência na produção do hormônio leptina.



Peptídeo inibitório gástrico (HOLNESS et al, 2011), estimulam a liberação de insulina na corrente sanguínea reduzindo a glicemia, normalizando-a. Considerando que diferentes trabalhos apontam a grelina como parte integrante deste mecanismo de regulação (FUKOMIRI et al, 2011; ADEGHATE & PONERY, 2002; DATE et al, 2002; LEE et al, 2002), investigamos a possível ação da grelina acilada na secreção de insulina *in vitro* dos camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados adultos em diferentes intervalos de tempo associados tanto a 1ª quanto a 2ª fase da liberação da insulina.

Desta forma, de acordo com os nossos dados a grelina acilada atuaria no controle glicêmico da seguinte maneira: Ela aumentaria a 2ª fase da secreção de insulina somente em presença de alta concentração de glicose. Os nossos camundongos controle exibiram elevação da secreção de insulina *in vitro* exclusivamente aos 30 minutos em presença de grelina acilada e glicose a 16,7 mM (278 mg/ dl). No tempo zero (0) minuto, quando as ilhotas pancreáticas permaneceram em presença de grelina acilada e glicose a 2,8 mM (47 mg/ dl), bem como aos 2, 5, 10 e 60 minutos quando as ilhotas estiveram em presença de grelina acilada e glicose a 16,7 mM, não detectamos alterações significativas da secreção de insulina *in vitro*.

Uma vez identificada a ação estimulatória da grelina acilada na secreção de insulina *in vitro* nos animais controle conduzimos nossas investigações em direção a possível participação da PAMPK e da PAKT (CASTAÑEDA et al, 2010) como mecanismos de atuação da grelina nas células  $\beta$  pancreáticas. Ainda assim, as ilhotas pancreáticas dos camundongos controle não demonstraram alterações significativas nos conteúdos de PAMPK/ Actina e de PAKT/ Actina em presença de grelina acilada. De modo adicional, observamos comportamento semelhante do conteúdo de GLUT2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle em presença de grelina.

Tendo em vista o perfil dos conteúdos de GLUT2/ Actina, PAMPK/ Actina e PAKT/ Actina apresentado pelas ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de grelina, procedemos nossas investigações considerando ser possível a existência de perturbações em nível de metabolismo mitocondrial.

Após a análise da razão do controle respiratório (RCR) averiguamos que a grelina acilada diminuiu o consumo de  $O_2$  pelas ilhotas pancreáticas dos camundongos controle. Inicialmente pareceu-nos contraditório haver aumento da

secreção de insulina e diminuição do consumo de O<sub>2</sub>, pois entendemos que a diminuição da utilização de O<sub>2</sub> implicaria na diminuição da síntese de ATP. Não obstante, segundo Maechler & Wollheim (2001), a exocitose da insulina é disparada pelo aumento da razão ATP/ ADP no citosol e pela abertura direta dos canais de cálcio tipo L nas células  $\beta$  pancreáticas (NAKATA et al, 2011).

Consta na literatura que em neurônios hipotalâmicos (KOHNO et al, 2008) e em células da próstata (DÍAZ-LEZAMA et al, 2010) a grelina atua diretamente nos canais de cálcio tipo L aumentando a concentração de cálcio intracelular, no entanto ainda não há relatos de que a grelina acilada promova a abertura desse tipo de canal nas células  $\beta$  pancreáticas.

Outra maneira de estimular a secreção de insulina é através da ativação dos receptores muscarínicos das células  $\beta$  pancreáticas (DUTTAROY et al, 2004; ZAWALICH et al, 2004). Até o momento sabemos que a administração intraperitoneal de grelina potencializou o efeito do agonista colinérgico carbacol estimulando a secreção de insulina em camundongos (SALEHI et al, 2004). Tal evidência aponta a via colinérgica como um dos possíveis mecanismos de ação pelos quais a grelina estimularia a secreção de insulina.

Tendo em vista às considerações supracitadas, entendemos que a grelina acilada melhorou a eficiência metabólica das células  $\beta$  pancreáticas, pois apesar de induzir menor consumo de O<sub>2</sub> pelas ilhotas pancreáticas houve elevação da secreção de insulina *in vitro* nos camundongos controle. Adicionalmente, não identificamos alterações significativas do conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais controle em presença de grelina.

Identificamos também que a grelina acilada não interferiu de maneira significativa na secreção de insulina *in vitro* nem no consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas quando o fator sobrepeso esteve presente. Porém, antes de abordarmos esta questão é importante apontar os efeitos prospectivos da hiperalimentação no processo de estímulo-secreção de insulina:

Observamos que o excesso de nutrientes no período de lactação modificou o perfil de secreção de insulina dos camundongos na idade adulta. Verificamos que as ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados exibiram aumento da secreção de insulina *in vitro* em presença de glicose, acompanhada da diminuição do consumo de O<sub>2</sub> em comparação ao controle. Compreendemos que a otimização da capacidade secretora das células  $\beta$  pancreáticas é um mecanismo de adaptação

à condição de intolerância à glicose apresentada por estes animais na idade adulta (MARTINS et al, 2008). Além disso, de acordo com colocação anterior, as ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados apresentaram elevação do conteúdo de GHSR1A/ Actina em comparação ao controle. Entendemos que este aumento do conteúdo de GHSR1A nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados é um mecanismo de adaptação à hipogrelinemia.

Identificamos que em presença de grelina acilada e glicose as ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados demonstraram aumento agudo da sua capacidade de transportar glicose. Segundo nossos resultados, os animais hiperalimentados apresentaram aumento do conteúdo de GLUT2/ Actina aos 5 minutos em comparação ao controle em presença de grelina e glicose estimulatória. Notadamente não encontramos diferenças significativas no conteúdo de PAMPK/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados em comparação aos animais controle em presença de grelina e glicose nos tempos estudados.

Demonstramos que apesar de elevar o conteúdo de GLUT2 e consequentemente aumentar a entrada de energia sob a forma de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas, a grelina acilada não interferiu de maneira significativa na secreção de insulina *in vitro* nos tempos: zero (0), 2, 5, 10, 30 e 60 minutos. De igual maneira não encontramos diferenças significativas no consumo de O<sub>2</sub> e conteúdo de UCP2/ Actina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos hiperalimentados diante de grelina nos tempos supracitados. Considerando a presença de estado hiperglicêmico-hiperinsulinêmico, entendemos como proveitoso o comportamento da grelina acilada em relação à exocitose de insulina nos camundongos hiperalimentados, pois um aumento ainda maior da secreção de insulina destes animais (haja vista ação da grelina nos animais controle) elevaria a possibilidade de exaustão das células  $\beta$  pancreáticas e o consequente comprometimento da capacidade secretora das mesmas (MIYAWAKI et al, 2008).

Destacamos ainda que as células  $\beta$  pancreáticas são dotadas de mecanismo de autopreservação associado à grelina. Tem sido demonstrado que a grelina acilada inibe a apoptose nas ilhotas pancreáticas ao interferir em diversas vias de sinalização relacionadas à proliferação e a sobrevivência celular, tais como a via da ERK1/2 (ZHANG et al, 2007), MAPKs, AKT e BCL2 (GRANATA et al, 2007). Sabendo-se que a energia proveniente da glicólise é imprescindível à síntese protéica e a renovação celular, entendemos que o aumento do conteúdo de GLUT2

nas ilhotas pancreáticas dos animais hiperalimentados em presença de grelina tem possível relação com o efeito antiapoptótico da grelina nas células  $\beta$  pancreáticas.

Verificamos que os efeitos prospectivos da hiperalimentação na lactação associaram-se a elevação da adiposidade, bem como alterações no perfil secreção de insulina e metabolismo da glicose, além do aumento da sensibilidade periférica à grelina nos camundongos adultos. Em relação à ação da grelina acilada na secreção de insulina *in vitro* dos camundongos controle observamos efeito estimulatório na idade adulta. Adicionalmente, identificamos que diante do fator sobrepeso a grelina acilada não foi capaz de estimular a secreção de insulina *in vitro* nos tempos estudados, todavia tal hormônio demonstrou-se eficiente modulador da capacidade transportadora de glicose nas células  $\beta$  pancreáticas dos camundongos *Swiss* hiperalimentados adultos.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados pode-se concluir que:

- 1) A hiperalimentação na lactação exacerbou o ganho de peso corporal nos camundongos *Swiss* ao longo de 120 dias. Verificamos ainda que o incremento de 20% no peso corporal dos camundongos hiperalimentados associou-se ao aumento do tecido adiposo branco notadamente da região retroperitoneal na idade adulta.
- 2) O consumo excessivo de nutrientes na lactação levou ao quadro de hiperglicemia acompanhada de hiperinsulinemia compensatória nos camundongos hiperalimentados adultos. Além destas alterações, detectamos diminuição da grelina plasmática de jejum nestes animais aos 120 dias.
- 3) Observamos que a grelina acilada estimulou a 2ª fase da secreção de insulina *in vitro* dos camundongos controle adultos em presença de glicose estimulatória. Tal efeito não foi associado à alteração dos conteúdos de GLUT2, PAMPK e PAKT nas ilhotas pancreáticas destes animais.
- 4) A grelina acilada diminuiu a razão do controle respiratório das ilhotas pancreáticas dos camundongos controle de 120 dias, todavia não apontamos alteração no conteúdo de UCP2 nas ilhotas destes animais.
- 5) Verificamos que a hiperalimentação na lactação conduziu ao aumento do conteúdo de GHSR1A nas ilhotas pancreáticas dos camundongos *Swiss* em comparação ao grupo controle na idade adulta e aumentou a secreção de insulina *in vitro*.
- 6) A grelina acilada elevou o conteúdo de GLUT2 nas ilhotas pancreáticas dos hiperalimentados adultos, todavia este hormônio não interferiu de forma significativa na secreção de insulina *in vitro*, nem no conteúdo de PAMPK, UCP2 e consumo de O<sub>2</sub> das ilhotas pancreáticas dos hiperalimentados em comparação ao grupo controle aos 120 dias de vida.

## REFERÊNCIAS

ABATE, N.; GARG, A.; PESHOCK, R. M.; STRAY-GUNDERSEN, J.; GRUNDY, S. M. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. **J Clin Invest.**, Dallas, v. 96, p. 88-98, Jul. 1995.

ADEGHATE, E. An update on the biology and physiology of resistin. **Cell Mol Life Sci.**, Al Ain, n. 61, p. 2485-2496, Out. 2004.

ADEGHATE, E.; PONERY, A. S. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. **J Neuroendocrinol.**, Al Ain, v. 14, n. 7, p. 555-560, Jul. 2002.

AFFOURTIT, C.; JASTROCH, M.; BRAND, M. D. Uncoupling protein-2 attenuates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E insulinoma cells by lowering mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med.**, Cambridge, v. 50, p. 609-616, 1 Mar. 2011.

AMARAL, A. G.; RAFACHO, A.; MACHADO DE OLIVEIRA, C. A.; BATISTA, T. M.; RIBEIRO, R. A.; LATORRACA, M. Q.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. **Pancreas**, Campinas, v. 39, n. 6, p. 847-855, Ago. 2010.

ANTHONY, N. M.; GAIDHU, M. P.; CEDDIA, R. B. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. **Obesity**, Toronto, v. 7, n. 17, p. 1312-1317, Jul. 2009.

ARIYASU, H.; TAKAYA, K.; TAGAMI, T.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; AKAMIZU, T.; SUDA, M.; KOH, T.; NATSUI, K.; TOYOOKA, S.; SHIRAKAMI, G.; USUI, T.; SHIMATSU, A.; DOI, K.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; NAKAO, K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. **J Clin Endocrinol and Metab.**, Kyoto, v. 86, n. 10, p. 4753-4758, Out. 2001.

ARVAT, E.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F.; DEGHENGHI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. **J Endocrinol Invest.**, Turin, v. 23, n. 8, p. 493-495, Set. 2000.

ARVAT, E.; MACCARIO, M.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; BENSO, A.; GOTTERO, C.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F.; DEGHENGI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS) in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **J Clin Endocrinol Metab.**, Turin, v. 5, n. 86, p. 1169-1174, Mar. 2001.

ASAKAWA, A.; INUI, A.; KAGA, T.; YUZURIHA, H.; NAGATA, T.; UENO, N.; MAKINO, S.; FUJIMIYA, M.; NIIJIMA, A.; FUJINO, M. A.; KASUGA, M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. **Gastroenterology**, Kobe, v. 120, n. 2, p. 337-345, Fev. 2001.

ASHCROFT, S. J. The beta-cell K(ATP) channel. **J Membr Biol.**, Oxford, v. 176, n. 3, p. 187-206, Ago. 2000.

BALABAN, G.; SILVA, G. A. P. Prevalência de sobrepeso em criança e adolescentes de uma escola da rede privada de Recife. **J Pediatr.**, Recife, n. 77, p. 96-100, Mar.-Abr. 2001.

BARAZZONI, R.; ZANETTI, M.; CATTIN, M. R.; VISINTIN, L.; VINCI, P.; CATTIN, L.; STEBEL, M.; GUARNIERI, G. Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver Akt signaling in rats. **Obesity**, Trieste, v. 15, n. 11, p. 2614-2623, Nov. 2007.

BARNETT, B. P.; HWANG, Y.; TAYLOR, M. S.; KIRCHNER, H.; PFLUGER, P. T.; BERNARD, V.; LIN, Y. Y.; BOWERS, E. M.; MUKHERJEE, C.; SONG, W. J.; LONGO, P. A.; LEAHY, D. J.; HUSSAIN, M. A.; TSCHÖP, M. H.; BOEKE, J. D.; COLE, P. A. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. **Science**, Baltimore, v. 330, n. 6011, p. 1689-1692, Dez. 2010.

BENNIS-TALEB, N.; REMACLE, C.; HOET, J. J.; REUSENS, B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. **J Nutr.**, Meknès, v. 129, n. 8, p. 1613-1619, Ago. 1999.

BERNAL-MIZRACHI, E.; FATRAI, S.; JOHNSON, J. D.; OHSUGI, M.; OTANI, K.; HAN, Z.; POLONSKY, K. S.; PERMUTT, M. A. Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. **J Clin Invest.**, Missouri, v. 114, n. 7, p. 928-936, Out. 2004.

BERNEY, D. M.; DESAI, M.; PALMER, D. J.; GREENWALD, S.; BROWN, A.; HALES, C. N.; BERRY, C. L. The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. **J Pathol.**, Bartholomew's, v. 183, n. 1, p. 109-115, Set. 1997.

BROGLIO, F.; GOTTERO, C.; ARVAT, E.; GHIGO, E. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. **Horm Res.**, Turin, v. 59, p. 109-117. 2003.

BROGLIO, F.; ARVAT, E.; BENSO, A.; GOTTERO, C.; MUCCIOLI, G.; PAPOTTI, M.; VAN DER LELY, A. J.; DEGHENGHI, R.; GHIGO, E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, Turin, v. 86, n. 10, p. 5083-5086, Out. 2001.

CARLSON, J. J.; TURPIN, A. A.; WIEBKE, G.; HUNT, S. C.; ADAMS, T. D. Pre-and post-prandial appetite hormone levels in normal weight and severely obese women. **Nutr & Metab.**, Utah, v. 32, n. 6, p. 1-8, Ago. 2009.

CASSONI, P.; PAPOTTI, M.; GHÈ, C.; CATAPANO, F.; SAPINO, A.; GRAZIANI, A.; DEGHENGHI, R.; REISSMANN, T.; GHIGO, E.; MUCCIOLI, G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in humans breast carcinomas and cell lines. **J Clin Endocrinol Metab.**, Turin, v. 4, n. 86, p. 1738-1745, Abr. 2001.

CASTAÑEDA, T. R.; TONG, J.; DATTA, R.; CULLER, M.; TSCHÖP, M. H. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. **Neuroendocrinol.**, Ohio, n. 31, p. 44-60, Jan. 2010.

CENNI, V.; SIRRI, A.; RICCIO, M.; LATTANZI, G.; SANTI, S.; DE POL, A.; MARALDI, N. M.; MARMIROLI, S. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. **Cell Mol Life Sci.**, Bologna, v. 60, n. 12, p. 2710-2720, Dez. 2003.

CIGOLINI, M.; TONOLI, M.; BORGATO, L.; FRIGOTTO, L.; MANZATO, F.; ZEMINIAN, S.; CARDINALE, C.; CAMIN, M.; CHIARAMONTE, E.; DE SANDRE, G.; LUNARDI, C. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-alpha? **Atherosclerosis**, Verona, v. 143, n. 1, p. 81-90, Mar. 1999.

CNOP, M.; HAVEL, P. J., UTZSCHNEIDER KM, CARR DB, SINHA MK, BOYKO EJ, RETZLAFF BM, KNOPP RH, BRUNZELL JD, KAHN SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. **Diabetologia**, Seattle, v. 46, n. 4, p. 459-469, Abr. 2003.



COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, p. 141-148, Mar. 1978.

COSTA, C. Lopes da; FREITAS, M. S. de; MOURA, A. S. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. **J Nutr Bioch.**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 236-241, Abr. 2004.

COSTA, R. F.; CINTRA, I. de P.; FISBERG, M. Prevalence of overweight and obesity in school children of Santos city, Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, São Paulo, v. 50, n.1, p. 60-67, Fev. 2006.

CUMMINGS, D. E.; PURNELL, J. Q.; FRAYO, R. S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B. E.; WEIGLE, D. S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes**, Washington, v. 50, p. 1714-1719, Ago. 2001.

CUMMINGS, D. E.; SHANNON, M. H. Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? **J Clin Endocrinol Metab.**, Washington, v. 7, n. 88, p. 2999-3002, Jul. 2003.

CUNHA, A. C.; PEREIRA, R. O.; PEREIRA, M. J. dos S.; SOARES, V. de M.; MARTINS, M. R.; TEIXEIRA, M. T.; SOUZA, E. P. G.; MOURA, A. S. M. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion the role of GLUT-2. **J Nutr Biochem.**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 435-442, Jun. 2009.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M. S.; SUGANUMA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Ghrelin, a novel growth hormone releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rat and human. **Endocrinol.**, Kiyotake, v. 11, n. 141, p. 4255-4261, Nov. 2000.

DATE, Y.; NAKAZATO, M.; HASHIGUCHI, S.; DEZAKI, K.; MONDAL, M. S.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; ARIMA, T.; MATSUO, H.; YADA, T.; MATSUKURA, S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. **Diabetes**, Miyazaki, v. 51, n. 1, p. 124-129, Jan. 2002.

DEENEY, J. T.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Metabolic control of beta-cell function. **Semin Cell Dev Biol.**, Boston, v. 11, n. 4, p. 267-275, Ago. 2000.

DEMMELMAR, H.; ROSEN, J. von; KOLETKO, B. Long-term consequences of early nutrition. **Early Hum Dev.**, Munich, v. 8, n. 82, p. 1-18, Ago. 2006.

DESPRÉS, J. P.; MOORJANI, S.; FERLAND, M.; TREMBLAY, A. LUPIN, P. J.; NADEAU, A.; PINAULT, S.; THÉRIAULT, G.; BOUCHARD, C. Adipose tissue

distribution and plasma lipoprotein levels in obese women. Importance of intra-abdominal fat. **Arteriosclerosis**, Quebec, v. 9, p. 203-210, Mar.-Abr. 1989.

DÍAZ-LEZAMA, N.; HERNÁNDEZ-ELVIRA, M.; SANDOVAL A, MONROY A, FELIX R, MONJARAZ E. Ghrelin inhibits proliferation and increases Ttype Ca<sup>2+</sup> channel expression in PC3 humanprostate carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, Puebla, v. 403, n. 1, p. 24-29, Dez. 2010.

DUTTARROY, A.; ZIMLIKI, C. L.; GAUTAM, D.; CUI, Y; MEARS, D.; WESS, J. Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Diabetes**, Bethesda, v. 53, p. 1714-1720, Jul. 2004.

DYCK, D. J.; HEIGENHAUSER, G. J.; BRUCE, C. R. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. **Acta Physiol.**, Ontario, n. 186, p. 5-16, Jan. 2006.

EBINA, Y.; ELLIS, L.; JARNAGIN, K.; EDERY, M.; GRAF, L.; CLAUSER, E.; OU, J. H.; MASIARZ, F.; KAN, Y. W.; GOLDFINE, I. D. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. **Cell**, California, v. 40, n. 4, p. 747-758, Abr. 1985.

EGIDO, E. M.; RODRIGUEZ-GALLARDO, J.; SILVESTRE, R. A.; MARCO, J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. **Eur J Endocrinol.**, Madrid, v. 146, n. 2, p. 241-244, Fev. 2002.

ELGHAZI, L.; BERNAL-MIZRACHI, E. Akt and PTEN: b-cell mass and pancreas plasticity. **Endocrinol and Metab.**, Saint-Louis, v. 20, n. 5, p. 243-251, Jul. 2009.

ENGLISH, P. J.; GHATEI, M. A.; MALIK, L. A.; BLOOM, S. R.; WILDING, J. P. Food fails to supress ghrelin levels in obese humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, Liverpool, v. 87, n. 6, p. 2984- 2987, Jun. 2002.

ESPELUND, U.; HANSEN, T. K.; HOJLUND, K.; BECK-NIELSEN, H.; CLAUSEN, J. T.; HANSEN, B. S.; ORSKOV, H.; JORGENSEN, J. O.; FRYSTYK, J. Fasting unmasks a strong inverse association between ghrelin and cortisol in serum: studies in obese and normal-weight subjects. **J Clin Endocrinol Metab.**, Aarhus C, v. 2, n. 90, p. 741-746, Fev. 2005.

FAIN, J. N.; MADAN, A. K.; HILER, M. L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S. W. Comparasion of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix,

and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinol.**, Tennessee, n. 145, p. 2273-2282, Mai. 2004.

FELIG, P. Pathophysiology of diabetes mellitus. **Med Clin North Am.**, v. 55, n. 4, p. 821-834, Jul. 1971.

FINEGOOD, D. T.; SCAGLIA, L.; BONNER-WEIR, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. **Diabetes**, Boston, v. 44, n. 3, p. 249-256, Mar. 1995.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucose corticoid. **J Clin Endocrinol Metab.**, New Jersey, n. 83, p. 847-850, Mar. 1998.

FRIEDMAN, J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. **Nutr Rev.**, New York, v. 60, p. 1-14, Out. 2002.

FUKUMORI, R.; YOKOTANI, A.; SUGINO, T.; ITOH, F.; KUSHIBIKI, S.; SHINGU, H.; MORIYA, N.; HASEGAWA, Y.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; OBITSU, T.; TANIGUCHI, K. Effects of amino acids infused into the vein on ghrelin-induced GH, insulin and glucagon secretion in lactating cows. **Anim Sci J.**, Higashi-Hiroshima, v. 82, n. 2, p. 267-273, Abr. 2011.

GALE, C. R.; ASHURST, H. E.; HALL, N. F.; MACCALLUM, P. K.; MARTYN, C. N. Size at birth and carotid atherosclerosis in later life. **Atherosclerosis**, Hants, v. 1, n. 163, p. 141-147, Jul. 2002.

GALE, C. R.; JIANG, B.; ROBINSON, S. M.; GODFREY, K. M.; LAW, C. M.; MARTYN, C. N. Maternal diet during pregnancy and carotid intima-media thickness in children. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Southampton, v. 8, n. 26, p. 1877-1882, Ago. 2006.

GASTALDELLI, A.; MIYAZAKI, Y.; PETTITI, M.; MATSUDA, M.; MAHANKALI, S.; SANTINI, E.; DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.**, Pisa, v. 87, n. 11, p. 5098-5103, Nov. 2002.

GASTALDELLI, A.; NATALI, A.; VETTOR, R.; CORRADINI, S. G. Insulin resistance, adipose depots and gut: Interactions and pathological implications. **Dig Liver Dis.**, Pisa, v. 42, n. 5, p. 310-319, Mai. 2010.

GIL-CAMPOS, M.; AGUILERA, C. M.; CAÑETE, R.; GIL, A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. **J Nutr.**, Cordoba, v. 96, n. 2, p. 201-226, Ago. 2006.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol.**, New York, v. 37, n. 10, p. 1974-1984, Out. 2005.

GNANAPAVAN, S.; KOLA, B.; BUSTIN S. A.; MORRIS, D. G.; MCGEE, P.; FAIRCLOUGH, P.; BHATTACHARYA, S.; CARPENTER, R.; GROSSMAN, A. B.; KORBONITS, M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, London, v. 87, n. 6, p. 2988-2991, Jun. 2002.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr.**, Southampton, v. 71, n. 5, p. 1344-1352, Mai. 2000.

GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T.; SATOMI, S.; MONACO, A. P. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. **Transplantation**, v. 40, p. 437-438, Out. 1985.

GRANATA, R.; SETTANNI, F.; BIANCONE, L.; TROVATO, L.; NANO, R.; BERTUZZI, F.; DESTEFANIS, S.; ANNUNZIATA, M.; MARTINETTI, M.; CATAPANO, F.; GHÈ, C.; ISGAARD, J.; PAPOTTI, M.; GHIGO, E.; MUCCIOLI, G. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase/Akt signaling. **Endocrinol.**, Turin, v. 148, n. 2, p. 512-29, Fev. 2007.

GU, W.; LI, X.; LIU, C.; YANG, J.; YE, L.; TANG, J.; GU, Y.; YANG, Y.; HONG, J.; ZHANG, Y.; CHEN, M.; NING, G. Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. **Endocrine**, Shanghai, v. 30, n. 2, p. 217-221, Out. 2006.

GUALILLO, O.; CAMINOS, J.; BLANCO, M.; GARCÌA-CABALLERO, T.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. **Endocrinol.**, Santiago, v. 2, n. 142, p. 788-794, Fev. 2001.

GUAN, X. M.; YU, H.; PALYHA, O. C.; MCKEE, K. K.; FEIGHNER, S. D.; SIRINATHSINGHJI, D. J.; SMITH, R. G.; VAN DER PLOEG, L. H.; HOWARD, A. D. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain Res.**, Rahway, v. 48, p. 23-29, Ago. 1997.

GUNGOR, N.; ARSLANIAN, S. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **Treatments in Endocrinology**, Pennsylvania, v. 6, n. 1, p. 359-371. 2002.

GUNGOR, N.; BACHA, F.; SAAD, R.; JANOSKY, J.; ARSLANIAN, S. Youth type 2 diabetes: insulin resistance, beta-cell failure, or both? **Diabetes Care**, Pittsburgh, v. 28, n. 3, p. 638-644, Mar. 2005.

GURNELL, M.; SAVAGE, D. B.; CHATTERJEE, V. K.; O'RAHILLY, S. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. **J Clin Endocrinol Metab.**, Pennsylvania, v. 88, n. 6, p. 2412-2421, 2003.

GUTIERREZ, J. A.; SOLENBERG, P. J.; PERKINS, D. R.; WILLENCY, J. A.; KNIERMAN, M. D.; JIN, Z.; WITCHER, D. R.; LUO, S.; ONYIA, J. E.; HALE, J. E. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. **Proc Natl Acad Sci.**, Greenfield, v. 105, p. 6320-6325, Abr. 2008.

HABER, E. C. Secreção de insulina: Efeito autócrino da Insulina e Modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 45, p. 219-227, Jun. 2001.

HANNON, T. S.; RAO, G.; ARSLANIAN, S. A. Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus. **Pediatrics**, Pennsylvania, n. 116, p. 473-480, Ago. 2005.

HATTORI, N.; SAITO, T.; YAGYN, T.; JIANG, B. H.; KITAGAWA, K.; INAGAKI, C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor and ghrelin expression in human T cells, B cells and neutrophils. **J Clin Endocrinol Metab.**, Osaka, v. 86, p. 4284-4291, Set. 2001.

HEIMBERG, H.; DE VOS, A.; PIPELEERS, D.; THORENS, B.; SCHUIT, F. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. **J Biol Chem.**, Brussel, v. 270, n. 15, p. 8971-8975, Abr. 1995.

HILL, D. J.; DUVILLIE, B. Pancreatic development and adult diabetes. **Pediatr Res.**, Ontario, v. 48, n. 3, p. 269-274, Set. 2000.

HILL, D.J.; HOGG, J. Growth factor control of pancreatic B cell hyperplasia. **Baillieres Clin Endocrinol Metab.**, v. 5, n. 4, p. 689-698, Dez. 1991.

HOLNESS, M. J.; HEGAZY, S.; SUGDEN, M. C. Signalling Satiety and Starvation to  $\beta$  Cell Insulin Secretion. **Diabetes**, London, v. 7, n. 5, p. 336-3345, Set. 2011.

HOLST, B.; CYGANKIEWICZ, A.; JENSEN, T. H.; ANKERSEN, M.; SCHWARTZ, T. W. High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor – Identification of a Potent Inverse Agonist. *Molecular. Endocrinol.*, Copenhagen, v. 11, n. 17, p. 2201-2210, Nov. 2003.

HORVATH, T. L.; BRUNING, J. C. Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat Med.*, v. 12, n. 1, p. 52-53, Jan. 2006.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv.*, Osaka, v. 2, n. 8, p. 494-503, Dez. 2002.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MIZUSHIMA, T.; SHIMIZU, S.; KANGAWA, K. Structural divergence of human ghrelin: Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem.*, Osaka, n. 278, p. 64-70, Jan. 2003.

HOWARD, A. D.; FEIGHNER, S. D.; CULLY, D. F.; ARENA, J. P.; LIBERATOR, P. A.; ROSENBLUM, C. I.; HAMELIN, M.; HRENIUK, D. L.; PALLYHA, O. C.; ANDERSON, J.; PARESS, P. S.; DIAZ, C.; CHOU, M.; LIU, K. K.; MCKEE, K. K.; PONG, S. S.; CHAUNG, L. Y.; ELBRECHT, A.; DASHKEVICZ, M.; HEAVENS, R.; RIGBY, M.; SIRINATSHINGHI, D. J.; DEAN, D. C.; MELILLO, D. G.; PATCHETT, A. A.; NARGUND, R.; PATRICK, R. G.; DEMARTINO, J. A.; GUPTA, S. K.; SCHAEFFER, J. M.; SMITH, R. G.; VAN DER PLOEG, L. H. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, Rahway, v. 273, p. 974-977, Ago. 1996.

IBGE. **Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população com 20 ou mais anos de idade por sexo, segundo unidades da Federação, áreas urbanas dos municípios, das capitais e regiões metropolitanas.** P. D. O. Familiares 2002-2003.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. *Physiol.*, Lausanne, v. 2, n. 79, p. 451-80, Abr. 1999.

KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; SUGIHARA, H.; WAKABAYASHI, I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, Tokyo, v. 50, p. 2438-2443, Nov. 2001.

KAUNG, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn.*, Ohio, v. 200, n. 2, p. 163-175, Jun. 1994.

KIM, M. S.; YOON, C. Y.; JANG, P. G.; PARK, Y. J.; SHIN, C. S.; PARK, H. S.; RYU, J. W.; PAK, Y. K.; PARK, J. Y.; LEE, K. U.; KIM, S. Y.; LEE, H. K.; KIM, Y. B.; PARK,

K. S. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, Seoul, v. 18, n.9, p. 2291-2301, Set. 2004.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Fisiologia**. Elsevier, 2009.

KOHNO, D.; SONE, H.; MINOKOSHI, Y.; YADA, T. Ghrelin raises  $[Ca^{2+}]_i$  via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. **Biochem Biophys Res Commun.**, Tochigi, v. 366, n. 2, p. 388-392, Fev. 2008.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; MATSUDO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, Osaka, v. 402, p. 656-660, Dez. 1999.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; KANGAWA, K. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Horm Res.**, Fukuoka, v. 56, n. 1, p. 93-97. 2001.

KRAUSE, M. S.; MCCLENAGHAN, N. H.; FLATT, P. R.; BITTENCOURT, P. I. de; MURPHY, C.; NEWSHOLME, P. L-arginine is essential for pancreatic  $\beta$ -cell functional integrity, metabolism and defense from inflammatory challenge. **J Endocrinol.**, Dublin, v. 211, n. 1, p. 87-97, Jul. 2011.

LANG, F.; ULLRICH, S.; GULBINS, E. Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. **Expert Opin Ther Targets**, Übingen, v. 15, n. 9, p. 1061-1071, Set. 2011.

LANG, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. **Eur J Biochem.**, Genève, v. 259, n. 1, p. 3-17, Jan. 1999.

LATORRACA, M. Q.; REIS, M. A.; CARNEIRO, E. M.; MELLO, M. A.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. **J Nutr.**, São Paulo, v. 128, n. 10, p. 1643-1649, Out. 1998.

LAUGHLIN, M. H.; SIMPSON, T.; SEXTON, W. L.; BROWN, O. R.; SMITH, J. K.; KORTHUIS, R. J. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. **J Appl Physiol.**, Columbia, v. 68, n. 6, p. 2337-2343, Jun. 1990.

LE ROUX, C. W.; PATTERSON, M.; VINCENT, R. P.; HUNT, C.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. **J Clin Endocrinol Metabol.**, London, v. 2, n. 9, p. 1068-1071, Fev. 2005.

LEÃO, S. C. Souza; ARAÚJO, L. M. B.; MORAES, L. T. L. P.; ASSIS, A. M. Prevalência de obesidade em escolares de Salvador, Bahia. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, Rio de Janeiro, n. 47, p. 151-157, Abr. 2003.

LECLERC, I.; RUTTER, G. A. AMP-Activated protein kinase: A new  $\beta$ -cell glucose sensor? Regulation by amino acids and calcium ions. **Diabetes**, Bristol, v. 5, p. 67-74, Dez. 2004.

LEE, H. M.; WANG, G.; ENGLANDER, E. W.; KOJIMA, M.; GREELEY, G. H. Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. **Endocrinology**, Galveston, v. 143, n. 1, p. 185-190, Jan. 2002.

LEIBEL, R. L.; CHUNG, W. K.; CHUA JR., S. C. The molecular genetics of rodent single gene obesities. **J Biol Chem.**, Columbia, v. 272, p. 31937-31940, Dez. 1997.

LEVIT, N. E. U.; LAMBERT, S. The fetal origins of the metabolic syndrome – a South African perspective. **Cardiovasc J S Afr.**, Cape Town, v. 4, n. 13, p. 179-180, Jul.-Ago. 2002.

LIHN, A. S.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. **Obes Rev.**, Aarhus Sygehus, v. 1, n. 6, p. 13-21, Fev. 2005.

LOMENICK, J. P.; CLASEY, J. L.; ANDERSON JW. Meal-related changes in ghrelin, peptide YY, and appetite in normal weight and overweight children. **Obesity**, Lexington, v. 3, n. 16, p. 547-552, Mar. 2008.

LONG, Y. C.; GLUND, S.; GARCIA-ROVES, P. M.; ZIERATH, J. R. Calcineurin regulates skeletal muscle metabolism via coordinated changes in gene expression. **J Biol Chem.**, Stockholm, v. 282, N. 3, p. 1607-1614, Jan. 2007.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J Nutr.**, London, v. 128, n. 2, p. 400-406, Fev. 1998.

LUIS D. A. de; ALLER, R.; IZAOLA, O.; SAGRADO, M. Gonzalez; CONDE, R; de la FUENTE, B. de la; CASTRILLON, J. L. Peres. Relationship of insulin resistance and adipocytokines on serum alanine aminotransferase in presurgical morbid obese patients. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, Valladolid, v. 6, n. 13, p. 413-418, Nov. 2009.



MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial function in normal and diabetic  $\beta$ -cells. **Nature**, Geneva, v. 414, p. 800-812, Dez. 2001.

MAEDA K.; OKUBO K.; SHIMOMURA I.; FUNAHASHI T.; MATSUZAWA Y.; MATSUBARA K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochem Biophys Res Commun.**, Suita, v. 221, n. 2, p. 286-289, Abr. 1996.

MARCUS, M. A.; MURPHY, L.; PI-SUNYER, F. X.; ALBU, J. B. Insulin sensitivity and serum triglyceride level in obese white and black women: relationship to visceral and truncal subcutaneous fat. **Metabolism**, New York, v. 48, p. 194-199, Fev. 1999.

MARTIN, J. R.; LIEBER, S. B.; MCGRATH, J.; SHANABROUGH, M.; HORVATH, T. L.; TAYLOR, H. S. Maternal ghrelin deficiency compromises reproduction in female progeny through altered uterine developmental programming. **Endocrinol.**, New Haven, v. 152, n. 5, p. 2060-2066, Mai. 2011.

MARTINS, M. R.; VIEIRA, A. K. G.; SOUZA, E. P. G. de; MOURA, A. S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. **J Endocrinol.**, Rio de Janeiro, v. 198, p. 591-598, Set. 2008.

MASUDA, Y.; TANAKA, T.; INOMATA, N.; OHNUMA, N.; TANAKA, S.; ITOH, Z.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, Ohra-gun, v.3, n. 276, p. 905-908, Out. 2000.

MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol Rev.**, Adelaide, v. 85, n. 2, p. 571-633, Abr. 2005.

MCTERNAN, P. G.; KUSMINSKI, C. M.; KUMAR, S. Resistin. **Curr Opin Lipidol**, Coventry, v. 2, n. 5, p. 170-175, Abr. 2006.

MEYER, C. Final Answer: Ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? **Diabetes**, Arizona, v. 59, p. 2145-2151, Nov. 2010.

MINER, J. L. The adipocyte as an endocrine cell. **J Anim Sci.**, Nebraska, v. 82, p. 935-942, Mar. 2004.

MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KLIM, Y. B.; LEE, A.; XUE, B.; UM, J.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; BIRNBAUM, M. J.; STUCK, B. J.; KAHN, B. B. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, Boston, v. 428, p. 569-574, Abr. 2004.

MIYAWAKI, K.; INOUE, H.; KESHAVARZ, P.; MIZUTA, K.; SATO, A.; SAKAMOTO, Y.; MORITANI, M.; KUNIKA, K.; TANAHASHI, T.; ITAKURA, M. Transgenic expression of a mutated cyclin-dependent kinase 4 (CDK4/R24C) in pancreatic beta-cells prevents progression of diabetes in db/db mice. **Diabetes Res Clin Pract.**, Tokushima, v. 82, n. 1, p. 33-41, Out. 2008.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; SOUZA A. L. de; POPKIN, B. M. The nutrition transition in Brazil. **Eur J Clin Nutr.**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 105-113, Fev. 1995.

MONTI, V.; CARLSON, J. J.; HUNT, S. C.; ADAMS, T. D. Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. **J Am Diet Assoc.**, Stanford, v. 6, n. 106, p. 822-828, Jun. 2006.

MOREIRA, A. S. B.; TEIXEIRA, M. T.; OSSO, F. S.; PEREIRA, R. O.; SILVA-JUNIOR, G. O.; SOUZA, E. P. G.; LACERDA, C. A. Mandarin de; MOURA, A. S. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutr Metab and Cardiovasc Diseases.**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 805-810, Dez. 2009.

MORI, S.; TAKIZAWA, M.; SATOU, M.; SAKASAI, M.; KUSUOKU, H.; NOJIRI, H.; YOSHIZUKA, N.; HOTTA, M.; KITAHARA, T.; HASE, T.; TAKEMA, Y.; SAITO, M.; YADA T. Enhancement of lipolytic responsiveness of adipocytes by novel plant extract in rat. **Exp Biol Med.**, Ochigi, v. 12, n. 234, p. 1445-1449, Dez. 2009.

MOURA, A. S.; CALDEIRA FILHO, J. S.; FREITAS, P. C. M.; SÁ, C. C de. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 179-192, Mai. 1997.

MOURA, A. S.; SÁ, C. C. N. F.; CRUZ, H. G.; COSTA, C. L. Malnutrition during lactation as ametabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. **Braz J Med and Biol Research.**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 617-662, Mai. 2002.

MUCCIOLI, G.; BROGLIO, F.; VALETTO, M. R.; GHÈ, C.; CATAPANO, F.; GRAZIANI, A.; PAPOTTI, M.; BISI, G.; DEGHENGHI, R.; GHIGO, E. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. **Ann Endocrinol.**, Turin, v. 1, n. 61, p. 27-31, Fev. 2000.

MURATA, M.; OKIMURA, Y.; IIDA, K.; MATSUMOTO, M.; SOWA, H.; KAJI, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; CHIHARA, K. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. **J Biol Chem.**, Kobe, v. 277, n. 7, p. 5667-5674, Fev. 2002.

NAKATA, M.; MANAKA, K.; YAMAMOTO, S.; MORI, M.; YADA, T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca(2+) influx through L-type channels in mouse islet  $\beta$ -cells. **Endocrinol J.**, Shimotsuke, v. 58, n. 4, p. 305-313, Fev. 2011.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. Role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, Kiyotake, v. 409, p. 194-198, Jan. 2001.

NALEPA, P.; PIECHNIK, A.; KIERSZTAN, A. Influence of bariatric surgery on remission of type 2 diabetes. **Postepy Hig Med Dosw**, Warszawski, v. 65, p. 804-818, Dez. 2011

NAZMI, A.; HUTTLY, S. R.; VICTORA, C. G.; LIMA, R. C.; POST, P. R.; ELIZALDE, J. W.; GERSON, B. M. Hb A1C in relation to intrauterine growth among male adolescents in southern Brazil. **Eur J Clin Nutr.**, Pelotas, v. 3, n. 61, p. 434-437, Mar. 2007.

NEARY, N. M.; GOLDSTONE, A. P.; BLOOM, S. R. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. **Clin Endocrinol**, London, v. 60, p. 153-160, Fev. 2004.

OTTO, B.; CUNTZ, U.; FRUEHAUF, E.; WAWARTA, R.; FOLWACZNY, C.; RIEPL, R. L.; HEIMAN, M. L.; LEHNERT, P.; FICHTER, M.; TSCHÖP, M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. **Eur J Endocrinol**, Munich, v. 5, n. 145, p. 669-673, Nov. 2001.

PANAMONTA, O.; THAMSIRI, N.; PANAMONTA, M. Prevalence of type II diabetes and metabolic syndrome among overweight school children in Khon Kaen, Thailand. **J Med Assoc Thai.**, Khon Kaen, v.93, n.1, p. 56-60, Jan. 2010.

PAPOTTI, M.; GHÈ C.; CASSONI, P.; CATAPANO, F.; DEGHENGHI, R.; GHIGO, E.; MUCCIOLI, G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. **J Clin Endocrinol Metabol.**, Turin, v. 10, n. 85, p. 3803-3807, Out. 2000.

PATEL, A. D.; STANLEY, S. A.; MURPHY, K. G.; FROST, G. S.; GARDINER, J. V.; KENT, A. S.; WHITE, N. E.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. **Regulatory Peptides**, London, v. 134, n. 1, p. 17-22, Mar. 2006.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor: a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.**, Boston, v. 9, n. 2, p. 89-109. 1998.

PENDE, M. mTOR, Akt, S6 kinases and the control of skeletal muscle growth. **Bull Cancer**, Paris, v. 93, n. 5, p. 39-43, May. 2006.

PERCIK, R.; STUMVOLL, M. Obesity and cancer. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**., Tel-Hashomer, v. 10, n.117, p. 563-566, Nov. 2009.

PESSIN, J. E; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**., Iowa, v. 106, n. 2, p. 165-169, Jul. 2000.

PINTO, S.; ROSEBERRY, A. G.; LIU, H.; DIANO, S.; SHANABROUGH, M.; CAI, X.; FRIEDMAN, J. M.; HORVATH, T. L. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. **Science**, New York, v. 304, n. 5667, p. 110-115, Apr. 2004.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; VOITS, M.; FINK, H.; ROHDE, W.; DÖRNER, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res**., Berlin, v. 836, p. 146-55, Jul. 1999.

PLAGEMANN, A.; HEIDRICH, I.; GÖTZ, F.; ROHDE, W.; DÖRNER, G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Exp Clin Endocrinol**., Berlin, v. 99, n. 3, p. 154-158. 1992.

POULIOT, M. C.; DESPRÉS, J. P.; NADEAU, A.; MOORJANI, S.; PRUD'HOMME, D.; LUPIEN, P. J.; TREMBLAY, A.; BOUCHARD, C. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. **Diabetes**, Quebec, v. 41, p. 826-834, Jul. 1992.

PRODUIT-ZENGAFFINEN, N.; DAVIS-LAMELOISE, N.; PERRETEEN, H.; BÉCARD, D.; GJINOVCI, A.; KELLER, P. A.; WOLLHEIM, C. B.; HERRERA, P.; MUZZIN, P.; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. **Diabetologia**, Geneva, v. 50, p.84-93, Jan. 2006.

RAHMOUNI, K. Obesity, Sympathetic Overdrive, and Hypertension. The Leptin Connection. **Hypertension**, v. 55, n. 4, p. 862-868, Apr. 2010.

RAJALA, M. W; SCHERER, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, New York, v. 144, n. 9, p. 3765-3773, Sep. 2003.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**., New York, v. 295, n. 7, p. 349-53, Aug. 1976.

REIMER, M. K.; PACINI, G.; AHRÉN, B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. **Endocrinology**, Lund, v. 144, n. 3, p. 916-921, Mar. 2003.

RICQUIER, D. L.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD, F. Molecular studies of the uncoupling protein. **FASEB J.**, Meudon, v. 5, p. 2237-2242, Jun. 1991.

ROBINSON, M. R.; SCHEUERMANN-FREESTONE, Michaela; LEESON, P.; CHANNON, K. M.; CLARKE, K.; NEUBAUER, S.; WIESMANN, F. Uncomplicated obesity is associated with abnormal aortic function assessed by cardiovascular magnetic resonance. **J Cardiovasc Magn Reson.**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 1-8, Feb. 2008.

ROBSON-DOUCETTE, C. A.; SULTAN, S.; ALLISTER, E. M.; WIKSTROM, J. D.; KOSHKIN, V.; BHATACHARJEE, A.; PRENTICE, K. J.; SEREDA, S. B.; SHIRIHAI, O. S.; WHEELER, M. B. Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. **Diabetes**, Toronto, n. 60, p. 2710-2719, Nov. 2011.

ROMERO-CORRAL, A.; CAPLES, S. M.; LOPEZ-JIMENEZ, F.; SOMERS, V. K. Interactions between obesity and obstructive sleep apnea: implications for treatment. **Chest**, Rochester, v. 3, n. 137, p. 711-719, Mar. 2010.

ROSE, D. P.; GILHOOLY, E. M.; NIXON, D. W. Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin. **Int J Oncol.**, New York, v. 6, n. 21, p. 1285-1292, Dec. 2002.

ROSS, R.; FREEMAN, J.; HUDSON, R.; JANSSEN, I. Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab.**, Ontario, v. 87, p. 5044-5051, Nov. 2002.

SALEHI, A.; COUR, C. DORNONVILLE de la; HÅKANSON, R.; LUNDQUIST, I. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. **Regul Pept.**, Lund, v. 118, n. 3, p. 143-150, May. 2004.

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

SANGAIO-ALVARELLOS, S.; CORDIDO, F. Effect of ghrelin on glucose-insulin homeostasis: Therapeutic implications. **Int J of Pept.**, Coruña, p. 1- 25, Feb. 2010.

SCAGLIA, L.; SMITH, F.E.; BONNER-WEIR, S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. **Endocrinol.**, Boston, v. 136, n.12, p. 5461-5468, Dec. 1995.

SCHERER, P. E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LODISH, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem.**, Cambridge, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, Nov. 1995.

SCHNEIDER, D. International trends in adolescent nutrition. **Soc Sci Med.**, New Brunswick, v. 51, n. 6, p. 955-967, Sep. 2000.

SEOANE, L. M.; AL-MASSADI, O.; LAGE, M.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Ghrelin: from a GH-secretagogue to the regulation of food intake, sleep and anxiety. **Pediatr Endocrinol Rev.**, Santiago, Spain, v. 3, n. 1, p. 432-437, Aug. 2004.

SHARMA, A. M.; TARNOPOLSKY, M. A. Regulating adiponectin: of flax and flux. **Diabetologia**, Hamilton, v. 6, n. 48, p. 1035-7, Jun. 2005.

SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MIZUTA, M.; DATE, Y.; MONDAL, MS.; TANAKA, M.; NOZOE, S.; HOSODA, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **J Clin Endocrinol Metab.**, Miyazaki, v. 1, n. 87, p. 240-244, Jan. 2002.

SHIMABUKURO, M.; WANG, M. Y.; ZHOU, Y. T.; NEWGARD, C. B.; UNGER, R. H. Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. **Proc Natl Acad Sci.**, Dallas, v. 95, n. 16, p. 9558-9561, Aug. 1998.

SHINTANI, M.; OGAWA, Y.; EBIHARA, K.; AIZAWA-ABE, M.; MIYANAGA, F.; TAKAYA, K.; HAYASHI, T.; INONE, G.; HOSODA, K.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; NAKAO, K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. **Diabetes**, Kyoto, v. 50, p. 227-232, Feb. 2001.

SICHERI, R.; SIQUEIRA, K. S.; MOURA, A. S. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 5, p. 614-618, May. 2000.

SIERVOGEL, RM.; ROCHE, A. F.; GUO, S. M.; MUKHERJEE, D.; CHUMLEA, W. C. Patterns of change in weight/stature<sup>2</sup> from 2 to 18 years: findings from long-term serial data for children in the Fels longitudinal growth study. **Int J Obes.**, Ohio, v. 15, n. 7, p. 479-485, Jul. 1991.

SINHA, M.K.; CARRO, J.F. Clinical aspects of leptin. **Vitam Horm.**, North Carolina, n. 54, p. 1-30. 1998.

SMALL, C.J.; BLOOM, S. R. Gut hormones and the control of appetite. **Trends Endocrinol Metab.**, London, v. 15, p. 259-263, Aug. 2004.

SOARES, V. M.; GARCIA-SOUZA, E. P.; LACERDA-MIRANDA, G.; MOURA, A. S. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. **Regul Pept.**, Rio de Janeiro, Nov. 2011.

SOWERS, M.; KARVONEN-GUTIERREZ, C. A.; PALMIERI-SMITH, R.; JACOBSON, J. A.; JIANG, Y.; ASHTON-MILLER, J. A. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. **Arthritis Rheum.**, Michigan, v. 10, n. 61, p. 1328-1336, Oct. 2009.

SRINIVASAN, M.; LAYCHOCK, S. G.; HILL, D. J.; PATEL, M. S. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. **Exp Biol Med. (Maywood)**, New York, v. 228, n. 1, p. 15-23, Jan. 2003.

STEINBERG, J.; DANIELS, S. R. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and metabolism). **Circulation**, n. 107, p. 1448-1453, Mar. 2003.

STEINBERG, J.; MORAN, A.; HONG, C. P.; JACOBS, D. R. J. R.; SINAIKO, A. R. Adiposity in childhood predicts obesity and insulin resistance in young adulthood. **J Pediatr.**, Minnesota, n. 138, p. 469-73, Apr. 2001.

STEPPAN, C. M.; LAZAR, M. A. The current biology of resistin. **J Int Med.**, Philadelphia, n. 255, p. 439-447, Apr. 2004.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, Leipzig, n. 365, p. 1333-1346, Apr. 2005.

SUN, Y.; ASNICAR, M.; SMITH, R. G. Central and peripheral roles of ghrelin on glucose homeostasis. **Neuroendocrinology**, Houston, n. 86, v. 3, p. 215-228, Sep. 2005.

TAL, M.; LIANG, Y.; NAJAFI, H.; LODISH, H. F.; MATSCHINSKY, F. M. Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. **J Biol Chem.**, Cambridge, v. 267, n. 24, p. 17241-17247, Aug. 1992.

TCHERNOF, A.; LAMARCHE, B.; PRUD'HOMME, D.; NADEAU, A.; MOORJANI, S.; LABRIE, F.; LUPIEN, P. J.; DESPRÉS, J. P. The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. **Diabetes Care**, Sainte-Foy, v. 19, p. 629-637, Jun. 1996.

THEANDER-CARRILLO, C.; WIEDMER, P.; CETTOUR-ROSE, P.; NOGUEIRAS, R.; PEREZ-TILVE, D.; PFLUGER, P.; CASTANEDA, T. R.; MUZZIN, P.; SCHÜRMANN, A.; SZANTO, I.; TSCHÖP, M. H.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. **J Clin Invest.**, Geneva, v. 116, n. 7, p. 1983-1993, Jul. 2006.

THORENS, B.; SARKAR, H. K.; KABACK, H. R.; LODISH, H. F. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell**, Cambridge, v. 55, n. 2, p. 281-290, Oct. 1988.

TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. **J Int Med.**, New York, v. 2, n. 257, p. 167-175, Feb. 2005.

TSCHOP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, Indianapolis, n. 407, p. 908-913, Oct. 2000.

TSCHOP, M.; WAWARTA, R.; RIEPL, R. I.; FRIEDRICH, S.; BIDLINGMAIER, M.; LANDGRAF, R.; FOLWACZNY, C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **J Endocrinol Invest.**, Munich, n. 24, p. 19-21, Jun. 2001.

UENO, N.; ASAKAWA, A.; INUI, A. Blunted metabolic response to fasting in obese mice. **Endocrine.**, Hyogo, v. 32, n. 2, p. 192-196, Oct. 2007.

UKKOLA, O. Peripheral regulation of food intake: new insights. **J Endocrinol Invest.**, Oulu, v. 27, p. 96-98, Jan. 2004.

UNGER, R. H. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. **Endocrinology**, Dallas, v. 144, n. 12, p. 5159-5165, Dec. 2003.



VETTOR, R.; MILAN, G.; ROSSATO, M. Review article: adipocytokines and insulin resistance. **Aliment Pharmacol Ther.**, Padova, n. 22, p. 3-10, Nov. 2005.

VOLANTE, M.; ALLIÀ, E.; GUGLIOTTA, P.; FUNARO, A.; BROGLIO, F.; DEGHENGI, R.; MUCCIOLI, G.; GHIGO, E.; PAPOTTI, M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. **J Clin Endocrinol Metab.**, Torino, v. 87, n. 3, p. 1300-1308, Mar. 2002.

WALTON, C.; LEES, B.; CROOK, D.; GODSLAND, I. F.; STEVENSON, J. C. Relationships between insulin metabolism, serum lipid profile, body fat distribution and blood pressure in healthy men. **Atherosclerosis**, London, v. 118, n. 1, p. 35-43, Nov. 1995.

WANG, Y.; NISHI, M.; DOI, A.; SHONO, T.; FURUKAWA, Y.; SHIMADA, T.; FURUTA, H.; SASAKI, H.; NANJO, K. Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. **FEBS Lett.**, Wakayama, Japan, v. 584, n. 8, p. 1503-1508, Mar. 2010.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **Am J Clin Nutr.**, Wakayama, Japan, v. 69, n. 2, p. 179-197, Apr. 1999.

WEIGLE, D. S.; CUMMINGS, D. E.; NEWBY, P. D.; BREEN, P. A.; FRAYO, R. S.; MATTHYS, C. C.; CALLAHAN, H. S.; PURNELL, J. Q. Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. **J Clin Endocrinol Metab.**, Seattle, v. 88, n. 4, p. 1577-1586, Apr. 2003.

WEISS, B.; STOFFEL, W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. **Eur J Biochem.**, Cologne, v. 249, n. 1, p. 239-247, Oct. 1997.

WEYER, C.; BOGARDUS, C.; MOTT, D. M.; PRATLEY, R. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, Phoenix, v. 104, n. 6, p. 787-794, Sep. 1999.

WHITE, M. F.; SHOELSON, S. E. et al. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. **J Biol Chem.**, Boston, v. 263, n. 6, p. 2969-2980, Feb. 1988.

WICKSTEED, B.; ALARCON, C.; BRIAUD, I.; LINGOHR, M. K.; RHODES, C. J. Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. **J Biol Chem.**, Seattle, v. 278, n. 43, p. 42080-42090, Oct. 2003.

WIERUP, N.; SVENSSON, H.; MULDER, H.; SUNDLER, F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. **Regul Pept.**, Lund, v. 107, p. 63-69, Jul. 2002.

WREN, A. M.; SMALL, C. J.; ABBOTT, C. R.; DHILLO, W. S.; SEAL, L. J.; COHEN, M. A.; BATTERHAM, R. I.; TAHERI, S.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**, London, v. 50, p. 2540-2547, Nov. 2001.

WYNNE, K.; STANLEY, S.; BLOOM, S. The gut and regulation of body weight. **J Clin Endocrinol Metab.**, London, v. 89, p. 2576-2582, Jun. 2004.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest.**, Cambridge, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, Dec. 2003.

YADA, T.; DEZAKI, K.; SONE, H.; KOIZUMI, M.; DAMDINDORJ, B.; NAKATA, M.; KAKEI, M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. **Diabetes**, Shimotsuke, v. 57, n. 1, p. 18-23, Feb. 2008.

YILDIZ, B. O.; SUCHARD, M. A.; WONG, M. L.; MCCANN, S. M.; LICINIO, J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. **Proc Natl Acad Sci.**, Los Angeles, v. 101, n. 28, p. 10434-10439, Jul. 2004.

YOON, J. C.; PUIGSERVER, P.; CHEN, G.; DONOVAN, J.; WU, Z.; RHEE, J.; ADELMANT, G.; STAFFORD, J.; KAHN, C. R.; GRANNER, D. K.; NEWGARD, C. B.; SPIEGELMAN, B. M. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, Boston, v. 409, n. 6825, p. 131-138, Sep. 2001.

ZAWALICH, W. S.; ZAWALICH, K. C.; TESZ, G. J.; TAKETO, M. M.; STERPKA, J.; PHILBRICK, W.; MATSUI, M. Effects of muscarinic receptor type 3 knockout on mouse islet secretory responses. **Biochem Biophys Res Commun.**, New Haven, v. 315, p. 872-876, Mar. 2004.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev Soc Cardiol.**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 574-589, Jul.-Ago. 2004.

ZHANG, C.Y.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A. J.; BOSS, O.; KIM, Y. B.; ZHANG, Y.; BINWU YING; LIXIN SHI; HONG FAN; DONGMEI YANG; DAN XU; YONGGANG WEI; XIAOBO HU; YONGGANG ZHANG; XIAOHONG ZHANG; TAO WANG; DAISHUN LIU; LIYANG DOU; GUO CHEN; FEI JIANG; FUQIANG WEN. Ghrelin inhibit cell apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cell line HIT-T15 via mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinase pathways. **Toxicology**, Guizhou, v. 237, p. 194-202, May. 2007.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, New York, v. 37, p. 425-432, Dec. 1994.

ZHENG, X. X.; WHEELER, M. B.; SHULMAN, G. I.; CHAN, C. B.; LOWELL, B. B. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. **Cell.**, Boston, v. 105, p. 745-755, Jun. 2001.

ZHOU, M.; LIN, B. Z.; COUGHLIN, S.; VALLEGA, G.; PILCH, P. F. UCP3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. **Am J Physiol.**, Boston, v. 279, n. 3, p. 622-629, Sep. 2000.