

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NAS
CONCENTRAÇÕES DE GRELINA, LEPTINA E NO EIXO GH-IGF EM RATOS
DIABÉTICOS**

JOSÉ ALEXANDRE CURIACOS DE ALMEIDA LEME

Rio Claro
Estado de São Paulo
Outubro-2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

***Campus* de Rio Claro**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NAS
CONCENTRAÇÕES DE GRELINA, LEPTINA E NO EIXO GH-IGF EM
RATOS DIABÉTICOS**

JOSÉ ALEXANDRE CURIACOS DE ALMEIDA LEME

Orientadora: ELIETE LUCIANO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do *Campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade, Área de Biodinâmica da Motricidade Humana

Rio Claro
Estado de São Paulo
Outubro-2010

AGRADECIMENTO

Agradeço:

A Deus pela vida e pela força na caminhada.

Aos meus pais por todo apoio, incentivo e, de forma particular, pela amizade e carinho que sempre dedicam desde minha infância até os dias de hoje. Agradecer aos meus pais é uma gota no mar de amor que dispensam continuamente a mim. Muito obrigado.

Aos familiares que foram base e fortaleza para todos os momentos.

Aos amigos, agradeço de coração, todos os momentos que passamos juntos. Amigos do laboratório, que foram muito importantes para o desenvolvimento deste projeto, agradeço sem exceção. Particularmente aos orientandos das professoras Eliete, Maria Alice, Cláudio e Eduardo, que contribuíram muito para esta tese: Rodrigo Dalia, Rafael Silveira, Alberto, Rodrigo Moura, Michel, Carla, Leandro, Zé Diego, Carol, Lucieli, Pedro, Gustavo e todos os outros que gostaria de citar, mas por limitações de tempo e espaço peço que sintam meu agradecimento no coração. De forma muito particular, agradeço ao Ricardo Contarteze pela sua passagem entre nós.

Aos amigos de república nesse período, Ricardo, Fábio e Marcelo, por compartilharmos momentos.

Aos amigos de Piracicaba que, sem exceção, foram muito importantes durante este período, particularmente Marcio Berlanga, por sua força em lutar pela vida e sabedoria.

Aos técnicos Eduardo e José Roberto. À Clarice, por todo ensino, pelo esforço no desenvolvimento principalmente das dosagens hormonais e pela amizade. Aos funcionários da UNESP, particularmente biblioteca, saepe, limpeza, restaurante universitário e cantina.

Aos professores Gustavo Rogatto, Ricardo Gomes, Rodrigo Pauli, Cláudio e Fúlvia Gobatto. Ao Cláudio, Angelina e Lilian pelo empenho na coordenação do programa. Ao professor Eduardo Kokubun com quem muito aprendi através do tripé ensino-pesquisa-extensão, mas também nas conversas fora destes. À professora Maria Alice, por todo trabalho em conjunto que realizamos, por todas as correções, ensinamento, incentivo, mas também pelas conversas extra-acadêmicas.

De forma muito particular, agradeço à professora Eliete Luciano, que nestes anos de orientação ensinou-me muito além dos limites da ciência e dos métodos. Mais que palavras, seus exemplos ensinaram-me sobre a vida. Nesses anos, cumpriu de forma brilhante seu papel de orientadora, mesmo em meio a um oceano de dificuldades e ocupações que, lutando contra o tempo, executou com eficácia e amor. Sou muito grato à Eliete e coloco-me na posição de um eterno orientando e aprendiz, admirando e respeitando muito, mesmo que indissociáveis, a professora doutora e a amiga Eliete. Também agradeço a sua família, Sra. Lidia e Prof. Edison.

Por fim, ao CNPq pelo apoio financeiro (142587/2007-9), ao Departamento de Educação Física e à Universidade Estadual Paulista pelo empenho em promover o curso de doutorado.

“Onde houver ódio, que eu leve o amor; Onde houver ofensa que leve o perdão; Onde houver discórdia que eu leve a união. Que eu procure mais consolar que ser consolado, compreender que ser compreendido, amar que ser amado.”

Francisco de Assis

RESUMO

Para investigar os efeitos do treinamento físico moderado nas concentrações de grelina, leptina, GH e IGF-I em ratos diabéticos, ratos *wistar* foram distribuídos nos seguintes grupos: controle sedentário, controle treinado, diabético sedentário e diabético treinado. A indução do diabetes foi feita por aloxana (32 mg/kg). Após determinação da carga equivalente à máxima fase estável do lactato (MFEL), o protocolo de treinamento físico de natação consistiu de 1 hora/dia, 5 dias/semana durante 8 semanas suportando uma carga equivalente à 90% da MFEL. Durante o período experimental foram registradas semanalmente a massa corporal e ingestão hídrica e alimentar. Ao final do período experimental, foi feita a eutanásia dos animais e o sangue foi coletado para determinação das concentrações de glicose, insulina, albumina, triglicerídeos, GH, IGF-I, grelina acilada e leptina. A massa do estômago foi registrada e foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: fígado para determinação de IGF-I, proteína, DNA e triglicerídeos; pâncreas para determinação de IGF-I, proteína e DNA; hipófise para determinação de GH, estômago para determinação de grelina, proteína e DNA e tecido adiposo epididimal para determinação de leptina, proteína e DNA. O diabetes experimental reduziu a massa e comprimento corporal além das concentrações no sangue de insulina, leptina, GH e IGF-I, mas aumentou as ingestões hídrica e alimentar, e as concentrações de triglicerídeos, glicose e grelina acilada sanguíneas. Nos animais diabéticos, o exercício físico promoveu redução da ingestão alimentar, diminuiu as concentrações sanguíneas de glicose e triglicerídeos e recuperou os valores de IGF-I. No fígado, o diabetes reduziu os valores de IGF-I, proteína e razão proteína/DNA, aumentou os valores de triglicerídeos que foram recuperados pelo treinamento físico. O diabetes ainda reduziu as concentrações de GH hipofisário, que não foi alterado pelo treinamento físico. Por outro lado, o treinamento aumentou os valores de IGF-I e a razão proteína/DNA no pâncreas dos animais diabéticos. No estômago, o diabetes reduziu o teor de DNA e aumentou a massa e a concentração de grelina acilada, enquanto o treinamento físico reduziu a massa e a concentração de grelina acilada nos animais diabéticos. O diabetes ainda reduziu os valores de leptina no tecido adiposo epididimal e aumentou o teor de DNA e a razão proteína/DNA neste tecido. O treinamento físico recuperou a leptina tecidual e o teor de DNA no tecido adiposo. Estes resultados suportam as seguintes conclusões: 1) A recuperação das concentrações de IGF-I no sangue e fígado de animais diabéticos treinados ocorreu de forma independente de alterações nas concentrações séricas e hipofisárias de GH; 2) O treinamento físico aeróbio promoveu aumento das concentrações de IGF-I no pâncreas, bem como da razão proteína/DNA, que pode indicar hipertrofia celular; 3) O treinamento físico aeróbio amenizou a hiperfagia diabética e esta melhora pode estar relacionada à recuperação dos baixos valores de leptina no tecido adiposo epididimal, redução da concentração de grelina na região fúndica do estômago e redução na massa do estômago. Desta forma, o treinamento físico realizado em intensidade equivalente a 90% da MFEL promove adaptações metabólicas e hormonais que podem contribuir para preservar o organismo diabético.

Palavras-chave: Diabetes. Treinamento Físico. Grelina. Leptina. IGF-I.

ABSTRACT

In order to investigate the effects of moderate physical training in the concentrations of ghrelin, leptin, GH and IGF-I in diabetic rats, Wistar rats were distributed in four groups: sedentary control, trained control, sedentary diabetic and trained diabetic. Experimental diabetes was induced by alloxan (32 mg / bw). After workload determination equivalent to maximal lactate steady-state (MLSS), the exercise training protocol consisted in swimming 1 h / day, 5 days / week during 8 weeks supporting a load equivalent to 90% of the MLSS. During the experimental period, weekly body mass, and water and food intake were recorded. At the end of the experiment, euthanasia was performed and the blood was collected to determine the level of glucose, insulin, albumin, triglycerides, GH, IGF-I, acylated ghrelin and leptin. The weight of the stomach was recorded and samples of the following tissues were collected: liver to determine IGF-I, protein, DNA and triglycerides; pancreas to determine IGF-I, protein and DNA; pituitary to determine GH; stomach to determine of ghrelin, protein and DNA and epididymal adipose tissue to determine leptin, protein and DNA. In addition to body weight and length, experimental diabetes also reduced blood concentrations of insulin, leptin, GH and IGF-I. Nevertheless, it increased water and food intake, and also the concentrations of triglycerides, blood glucose and acylated ghrelin. In diabetic rats, exercise caused a reduction of food intake, blood concentrations of glucose and triglycerides, and recovery blood IGF-I. In the liver, diabetes reduced the IGF-I, protein and protein/DNA ratio values, and increased triglycerides level, which was recovered by physical training in these parameters. Diabetes also reduced pituitary GH concentrations, which did not alter by physical training. On the other hand, training increased IGF-I and protein / DNA ratio values in the pancreas of diabetic rats. In the stomach, diabetes reduced the concentration of DNA and increased weight and ghrelin acylated concentration, whereas physical training reduced mass and ghrelin acylated concentration in diabetic animals. Diabetes also reduced leptin levels in epididymal adipose tissue, and increased DNA content and the protein/DNA ratio in this tissue. Physical training restored tissue leptin and DNA content in adipose tissue. These results support the following conclusions: 1) The recovery of blood and liver IGF-I of trained diabetic rats occurred independently of changes in serum and pituitary GH, 2) Exercise training increased concentrations of IGF-I in the pancreas, as well as the protein / DNA ratio, which may indicate cellular hypertrophy, 3) Exercise training attenuated diabetic hyperphagia. This improvement may be related to the recovery of low levels of leptin in epididymal adipose tissue, reduced concentration of ghrelin in the fundus of the stomach and reduction of stomach weight. Thus, physical training performed in intensity equivalent to 90% of MLSS promotes metabolic and hormonal changes that can preserve the diabetic organism.

Keywords: Diabetes Mellitus. Physical Training. Ghrelin. Leptin. GH. IGF-I.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	29
Tabela 2	34
Tabela 3	36
Tabela 4	37
Tabela 5	39
Tabela 6	40
Tabela 7	42
Tabela 8	44
Tabela 9	46
Tabela 10	47
Tabela 11	49
Tabela 12	51
Tabela 13	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	19
Figura 2	28
Figura 3	35
Figura 4	36
Figura 5	38
Figura 6	39
Figura 7	41
Figura 8	43
Figura 9	45
Figura 10	46
Figura 11	48
Figura 12	50
Figura 13	51
Figura 14	53

SUMÁRIO

	PÁGINAS
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Diabetes e treinamento físico	14
3.2 Eixo GH-IGF, diabetes e treinamento físico	16
3.3 Ações da grelina no eixo GH-IGF e no controle da fome.....	20
3.4 Grelina e exercício físico	22
3.5 Leptina, hiperfagia diabética e exercício físico	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Indução do diabetes e delineamento experimental	26
4.2 Protocolo de treinamento	27
4.3 Avaliações prévias ao sacrifício dos animais	29
4.4 Avaliações após o sacrifício dos animais	29
4.5 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS	68
9 APÊNDICE	86
10 ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

Dados do Atlas do Diabetes da *International Diabetes Federation* (2009) revelaram que o *Diabetes Mellitus* afeta cerca de 246 milhões de pessoas no mundo. A prevalência mundial atual (2010) do diabetes é estimada em 6% e as projeções estimam que em 2025 seja de 7,3%. No Brasil, em 2010, existem aproximadamente 7,6 milhões de pessoas diabéticas e a estimativa é que o diabetes atinja 7,7% da população em 2030 (IDF, 2007). Mais especificamente o diabetes mellitus tipo 1, atualmente, afeta aproximadamente 22,4 milhões de pessoas no mundo. Um aumento na incidência deste tipo de diabetes entre crianças e jovens ocorreu na segunda metade do século passado e, possivelmente, continuará nos próximos anos, particularmente para crianças e jovens europeus (GALLE et al., 2002; PATTERSON et al., 2009).

A comunidade científica tem intensificado os esforços em desvelar os fenômenos e mecanismos de ação da fisiopatologia diabética no objetivo de encontrar formas de prevenção e tratamento. Um dos importantes focos de pesquisas envolve as alterações endócrino-metabólicas decorrentes da deficiência na produção da insulina.

Dentre as alterações endócrino-metabólicas da hipoinsulinemia estão as encontradas no eixo hormônio do crescimento(GH)-fator de crescimento semelhante à insulina(IGF), que são de fundamental importância no desenvolvimento do quadro diabético, prejudicando o crescimento corporal e os desenvolvimentos teciduais. Estudos realizados em animais diabéticos aloxânicos demonstraram reduções nas concentrações séricas de GH e IGF-I, bem como das concentrações de IGF-I em importantes tecidos como músculo esquelético, fígado e hipocampo (LI et al., 2004; GOMES et al., 2006, 2009; LEME et al., 2009).

A hiperfagia diabética, outra importante característica desta doença, também pode estar relacionada a alterações hormonais. A insulina, a leptina e, mais recentemente descoberta, a grelina estão envolvidas no controle da fome e da saciedade e alterações nas concentrações destes hormônios parecem estar associadas à hiperfagia diabética.

A insulina e a leptina tem funções semelhantes no controle da fome, contribuindo para ações anorexigênicas no hipotálamo. A ausência da produção da insulina ou mesmo o prejuízo em sua ação, podem alterar a leptinemia.

De grande relevância para o quadro diabético é o fato da grelina, que estimula os neurônios orexígenos e atua como secretagogo do GH, estar alterada nas condições de hipoinsulinemia. Contudo, a relação entre estes hormônios no quadro diabético necessita de esclarecimentos mais profundos.

Diversos agentes farmacológicos e não farmacológicos têm papel importante ao amenizar os efeitos deletérios do quadro diabético. Dentre estes agentes está o exercício físico, apontado como pedra fundamental na prevenção e tratamento diabético.

Estudos têm evidenciado o importante papel do treinamento físico ao reduzir alguns dos prejuízos causados pelo diabetes no eixo GH-IGF e no controle da fome. Porém diversas lacunas ainda necessitam ser preenchidas como as concentrações de GH na hipófise e IGF-I no pâncreas. Igualmente, os efeitos do treinamento físico nos hormônios grelina e leptina no organismo diabético foram pouco investigados.

2 OBJETIVOS

Esta tese foi delineada para investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio realizado na intensidade equivalente a 90% da máxima fase estável do lactato sobre hormônios relacionados ao eixo GH-IGF-I e hormônios relacionados ao controle da fome e da saciedade.

Os objetivos específicos foram avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio em animais diabéticos aloxânicos sobre as seguintes concentrações:

- Séricas de glicose, albumina, insulina e triglicerídeos;
- GH no sangue e hipófise;
- IGF-I no sangue, fígado e pâncreas, bem como triglicerídeos, proteínas e DNA hepáticos além de proteína e DNA pancreáticos;
- Grelina no sangue e estômago, bem como proteína e DNA gástricos;
- Leptina no sangue e no tecido adiposo epididimal, bem como proteína e DNA no tecido adiposo epididimal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES E TREINAMENTO FÍSICO

O *Diabetes Mellitus* é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que têm como característica comum a deficiência na produção e/ou ação da insulina que resulta em anormalidades metabólicas, particularmente a hiperglicemia. A insulina, um polipeptídeo anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, ativa na célula alvo uma cascata de reações que intermedeiam o transporte da glicose para o interior celular, finalizada com a aproximação dos transportadores de glicose (GLUT) junto à membrana. Além da hiperglicemia, a ausência ou ineficácia da ação da insulina pode reduzir a entrada de aminoácidos nos músculos e aumentar a lipólise (ADA, 2010).

O diabetes pode ser classificado em suas diversas formas, dentre as quais os mais comuns são o *Diabetes Mellitus* tipos 1 e 2 (ADA, 2010). O *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DMT2) é caracterizado por extensa resistência à insulina e relativa ou nenhuma deficiência na secreção deste hormônio (REAVEN et al., 1976; POTIER et al., 2005) não sendo encontrada destruição auto-imune das células beta pancreáticas. Fatores de predisposição genética e adquiridos influenciam na redução da sensibilidade à insulina, podendo levar a diminuição da concentração e da atividade quinase do receptor de insulina, da concentração e da fosforilação dos substratos do receptor (IRS-1 e -2), da atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), da translocação dos GLUTs e da atividade de enzimas intracelulares (PESSIN; SATIEL, 2000). O risco de desenvolvimento desta doença aumenta com a obesidade, sedentarismo e idade, prevalecendo em indivíduos adultos (ZIMMET, 1992). O *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DMT1) é definido como resultado de fatores ambientais agindo em indivíduos geneticamente susceptíveis resultando em absoluta deficiência na secreção da insulina. Dentre os fatores ambientais que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença estão micróbios (LAMMI et al., 2005), dieta e toxinas (COSGROVE, 2004).

A instauração do diabetes gera determinados sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, perda da clareza na visão, prejuízo no

crescimento, susceptibilidade a infecções e posterior cetoacidose. A permanência do quadro diabético pode causar dano, disfunção ou deficiência em diversos órgãos. Dentre os tecidos mais comumente afetados estão os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. As complicações do diabetes são desenvolvidas em longo prazo, oriundas da hiperglicemia e demais prejuízos metabólicos e de micro e macroangiopatias, podendo culminar em retinopatia com perda crescente da visão, nefropatia, neuropatia, disfunções gastrintestinais, geniturinárias, cardiovasculares e sexuais (ADA, 2006).

Para prevenção e controle do *Diabetes Mellitus* são indicados medicamentos orais, injeção de insulina, balanço nutricional e atividade física (ADA, 2005). Os primeiros achados que associavam desenvolvimento do diabetes ao estilo de vida sedentário remetem ao século XVIII, nos quais era estimulada a utilização terapêutica do exercício físico no tratamento diabético (WARREN e CONSTANTINI, 2000). Contudo, os primeiros resultados experimentais parecem estar nos estudos de Pentzoldt e Noorden (PENTZOLDT; NOORDEN apud DISPENSARIES, 1899) que realizaram uma série de experimentos em pacientes diabéticos, investigando a influência do trabalho muscular nas concentrações de glicose na urina e concluíram que a glicosúria diminuiu regularmente nestes indivíduos. Em trabalho publicado em 1899, Dispensaries apresenta o ciclismo como benéfico no tratamento do diabetes. Desde então, diversos estudos buscam intensamente desvendar estes fenômenos relacionados ao exercício e diabetes, bem como os mecanismos de ação que os induzem. Apesar dos esforços da comunidade científica, ainda há muitas questões importantes a serem respondidas nesta linha de pesquisa.

Em cuidadosa revisão, Weltman e colaboradores (2009) corroborando com o consenso previamente realizado pela Associação Americana de Diabetes (ADA) em 2006, concluíram afirmando que o exercício físico é eficaz para a prevenção de diabetes tipo 2, bem como tratamento para diabetes tipo 1 e tipo 2.

Estas alterações podem ser encontradas no exercício agudo e/ou crônico. A insulina e o exercício têm efeitos similares estimulando a translocação dos GLUT-4, contudo estes efeitos ocorrem por diferentes vias, sendo que, mesmo na ausência de insulina a atividade contrátil muscular é capaz de estimular a translocação de GLUT-4. O mecanismo exato para haver a translocação permanece incerto, sendo propostas algumas hipóteses. A participação da proteína quinase ativada por

mitógenos (MAPK) parece ser um ponto chave, sendo aumentada sua atividade na contração muscular o que promove a translocação das vesículas contendo GLUT-4. O aumento das concentrações de cálcio miocelular e a presença de óxido nítrico também são aceitos como mediadores para translocação dos GLUT-4 estimulados pela contração muscular (JESSEN; GOODYEAR, 2005).

O efeito agudo do exercício no transporte de glicose tende a diminuir, sendo substituído por um aumento na sensibilidade e responsividade à insulina. O aumento na sensibilidade à insulina resulta em deslocamento da curva dose-resposta, tornando necessária menor concentração de insulina para alcançar 50% da resposta máxima de transporte de glicose (HOLLOSZY, 2005). Tal aumento é mediado pela translocação de maior número de GLUT4 para a superfície celular em resposta ao estímulo da insulina (HOLLOSZY, 2005). Além disso, ocorre aumento na ligação da insulina ao seu receptor (IR). O treinamento contribui para potencializar outros pontos da via de sinalização da insulina. Luciano e colegas (2002) mostraram que o aumento da fosforilação do IRS e aumento da atividade da PI3-kinase causados pelo treinamento físico induzem melhora na responsividade à insulina em animais diabéticos aloxânicos. Em cuidadosa revisão da literatura, Pauli e colaboradores (2009) apresentaram novos mecanismos de ação do exercício físico na resistência à insulina induzida pela obesidade, dentre os quais destacam a redução da expressão e/ou atividade de proteínas intracelulares que afetam a sinalização da insulina, tal como a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), jun N-terminal quinase (JNK), inibidor kappa quinase (IKK) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS).

3.2 EIXO GH-IGF-I, DIABETES E TREINAMENTO FÍSICO

O crescimento corporal está relacionado a diversos fatores, dentre os quais está o eixo GH-IGF, uma complexa interligação de hormônios, proteínas transportadoras e receptores.

O hormônio do crescimento (GH) é uma molécula protéica composta por 191 aminoácidos que circula, ao menos em parte, ligado a proteínas transportadoras do GH denominadas GHBP, que podem prolongar a atividade biológica deste hormônio. Até o momento, sabe-se que secreção do GH pela hipófise anterior é estimulada pelo hipotálamo, que secreta o hormônio liberador de GH (GHRH) e pela grelina, hormônio predominantemente secretado pelas células Gr do trato gastrointestinal (KOJIMA et al., 1999). Contudo, o hipotálamo também sintetiza a somatostatina (SS), responsável pela inibição da secreção de GH. Sabe-se que a secreção do GH no homem e também em ratos, segue um padrão pulsátil de secreção (ORTIZ-CARO et al., 1984; LEROITH et al., 2001).

Em experimentação animal, diversos estudos demonstraram haver redução nas concentrações de GH no sangue em animais diabéticos, quer seja o diabetes induzido por aloxana (LUCIANO; MELLO, 1998; GOMES et al., 2003, 2006) ou por estreptozotocina-STZ (BLUET-PAJOT et al., 1983) de forma evidente quando esta é administrada em única e alta dose (KIM et al., 2006). Também as concentrações de GH na hipófise são reduzidas nos animais diabéticos apesar de não haverem alterações nas representações somatotrópicas (BLUET-PAJOT et al., 1983; OLCHOVSKY et al., 1991). Desta forma, a secreção de GH pela hipófise parece ser diminuída em animais diabéticos experimentais (OLCHOVSKY et al., 1991).

Se por um lado, o treinamento físico aeróbio tem demonstrado interessantes resultados em amenizar diversos prejuízos causados pelo diabetes, as baixas concentrações de GH no sangue de animais diabéticos parecem não ser alteradas pelo treinamento físico aeróbio moderado (LUCIANO; MELLO, 1998; GOMES et al., 2006). Desta forma, estas evidências suportam a formulação de novas questões, dentre as quais estão as relacionadas ao comportamento da hipófise neste contexto.

O estudo das concentrações hipofisárias de GH em animais diabéticos treinados pode contribuir para esclarecer um pouco mais sobre este fenômeno.

Outro elemento muito importante para o crescimento corporal é o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Os IGFs são polipeptídios constituídos por 70 aminoácidos e são responsáveis por intermediar as ações do GH que, ao se ligar ao receptor, induz uma cascata de eventos que culminam na secreção do IGF. Por essa função fora originalmente chamado de somatomedina. O IGF pode atuar de forma endócrina, parácrina ou autócrina estimulando o crescimento, proliferação e diferenciação celulares em diversos tecidos. Participam do sistema IGF dois ligantes primários o IGF-I e -II, três receptores de membrana (receptores de IGF-I, IGF-II e insulina), proteínas transportadoras de IGF (IGFBPs) e uma glicoproteína denominada subunidade ácido lábil-ALS (FRYSTICK, 2004).

O principal órgão sintetizador de IGF-I circulante é o fígado, responsável por cerca de 75% da produção total, demonstrado por Sjogren e colaboradores (1999) ao estudarem animais com completa ausência da produção de IGF-I pelos hepatócitos. Todavia, este peptídeo é sintetizado pela maioria das células (SJROGREN, 2002). Tal síntese pode ocorrer em resposta à ativação promovida pelo GH ou de forma independente (POLLAK; ROSEN, 1999).

Em experimentação animal, a indução do diabetes por aloxana ou STZ causa redução nos valores das concentrações de IGF-I sérico em ratos *Wistar* e *Sprague Dawley* (LI et al., 2004; GOMES et al., 2006; LEME et al., 2007). Alterações no IGF-I tecidual também pode ser observada em determinados órgãos de animais diabéticos. A concentração deste peptídeo, analisada através de técnica de dosagem de IGF-I em amostras teciduais, esteve diminuída no fígado (LI et al., 2004; LEME et al., 2007), músculo (GOMES et al., 2006) e em regiões do cérebro como hipocampo (GOMES et al., 2009). No tecido pancreático, Hansson e colaboradores (1988) usando técnica similar demonstraram não haver alterações no IGF pancreático de animais diabéticos. No mesmo estudo, o autor realizou hipofisectomia e observou redução do RNAm de IGF-I nas células alfa, beta e delta pancreáticas, sendo possível, nesta situação, um efeito direto da ausência do GH. A redução das concentrações de GH em animais diabéticos dificulta a compreensão desta relação neste modelo experimental. Além da ausência de alterações nas

concentrações de IGF-I no pâncreas diabético, estudos mais recentes foram direcionados para observar os possíveis efeitos do IGF-I no pâncreas diabético.

Apesar da evidente relevância, estudos envolvendo os efeitos do IGF-I na regeneração pancreática apresentam resultados conflitantes. Estudos realizados com animais que superexpressam IGF-I pancreático demonstraram recuperação do diabetes induzido por STZ após acelerada regeneração das células beta (GEORGE et al., 2002). Robertson e colaboradores (2008) demonstraram que, em condições normais, a superexpressão de IGF-I no pâncreas não promove o crescimento celular nas ilhotas pancreáticas enquanto que pouco tempo após a injeção de STZ os animais transgênicos demonstraram reduzida apoptose das células beta. Contudo, outros estudos têm contestado a importância do IGF-I para regeneração de células beta, demonstrando que o IGF-I tem um efeito inibitório, mesmo que indireto, no crescimento celular das ilhotas (LU et al., 2004).

Em síntese, o eixo GH-IGF é um dos aspectos no qual o treinamento físico parece contribuir para amenizar determinados prejuízos no organismo diabético. Todavia, existem questões a serem respondidas, tais como relacionadas aos efeitos do treinamento no organismo diabético nas concentrações teciduais de GH na hipófise e IGF-I no pâncreas, bem como as concentrações da grelina, um importante secretagogo do GH (Figura 1).

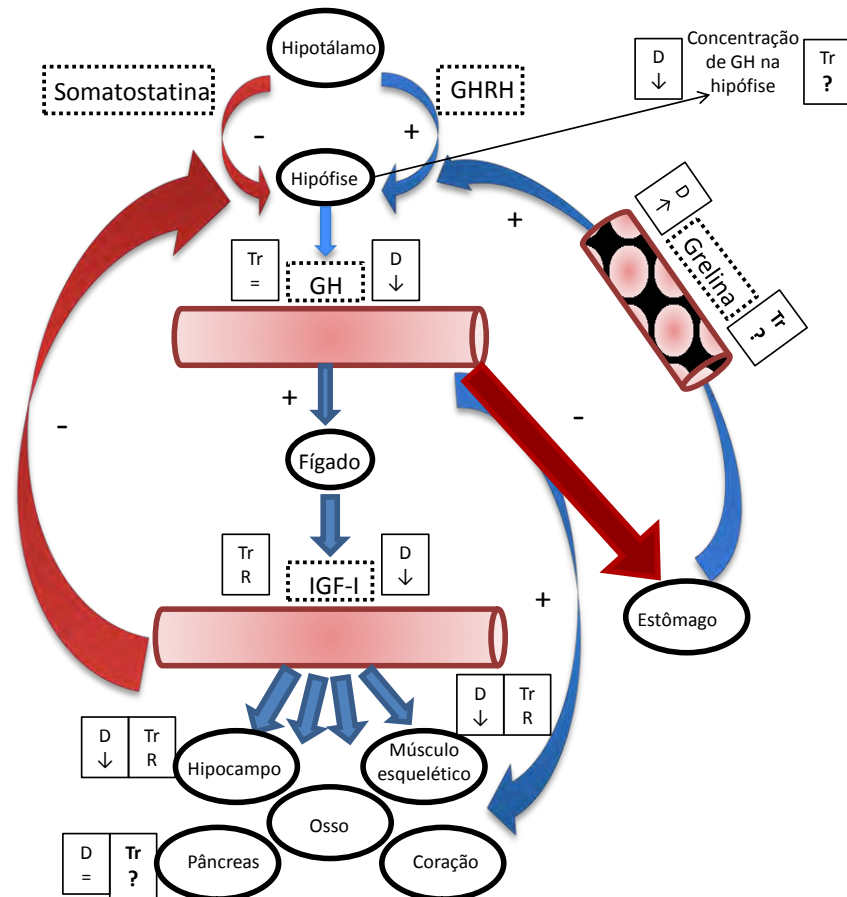


Figura 1. Esquema resumido de alguns efeitos do treinamento físico no eixo GH-IGF-I em animais diabéticos aloxânicos. A secreção do hormônio do crescimento (GH) pela hipófise é estimulada (+) pelos hormônios GHRH e grelina e inibida (-) pela somatostatina. A ligação do GH ao seu receptor promove a secreção de IGF-I nos tecidos-alvo para efetuar ações de forma endócrina, parácrina e autócrina. A secreção de GH, por sua vez, é influenciada por alça inibitória pelas concentrações do próprio GH e IGF-I no sangue. Da mesma forma, a produção e secreção de grelina é inibida pela presença sanguínea de GH. O diabetes experimental aloxânico (D) parece aumentar (↑) as concentrações de grelina no sangue, reduzir (↓) as concentrações de GH no sangue e hipófise, de IGF-I no sangue, fígado, músculo esquelético e hipocampo, sem alterar (=) no pâncreas. O treinamento físico aeróbico em animais diabéticos experimentais (Tr) parece recuperar (R) as concentrações de IGF-I no sangue, fígado, músculo e hipocampo, sem alterar o GH sanguíneo. Em animais diabéticos experimentais, os efeitos do treinamento físico aeróbico nas concentrações de IGF-I no pâncreas, GH na hipófise e grelina no sangue e estômago não são conhecidas.

3.3 AÇÕES DA GRELINA NO EIXO GH-IGF E NO CONTROLE DA FOME

Na busca por esclarecer melhor a interação entre as substâncias envolvidas no eixo GH-IGF, a partir de 1984, com estudos de Bowers e colaboradores, foi inserida uma nova classe de secretagogos de GH (GHS), melhor entendida após a clonagem do receptor de GHS (GHS-R) apresentada nos trabalhos de Howard e Pong e devidos colaboradores (1996). Desta forma, em 1999, foi isolado por Kojima e colaboradores um novo peptídeo nas células endócrinas gástricas, que ativa a secreção de GH pela ligação e ativação do GHS-R que, então, fora chamada de grelina. O nome grelina é oriundo do inglês *ghrelin* (*Ghre* em linguagem proto-indo-européia corresponde a *grow* que significa crescimento) (KOJIMA et al., 2005).

A grelina é composta de 28 aminoácidos com uma modificação octanóica no seu grupo hidroxil sobre a serina 3 e foi isolada da mucosa oxíntica do estômago (KOJIMA et al., 1999). Dois terços da grelina circulante é produzida nas células Gr da mucosa oxíntica do estômago (DATE et al., 2000). Pequenas quantidades de grelina, contudo, são também produzidas em outros tecidos como pâncreas, placenta, gônadas, tireóide, adrenal, rim, coração, olhos, pituitária e hipotálamo, entre outros, produzindo efeitos principalmente autócrino/parácrino (VAN DER LELY et al., 2004; HOSODA et al., 2006; KOJIMA; KANGAWA, 2006; DAVENPORT et al., 2005; KOJIMA et al., 2005; TRITOS; KOKKOTOU, 2006; ROCHA-SOUSA et al., 2006; GNANAPAVAN et al., 2002).

Para agir, a grelina se liga ao seu receptor (GHS-R1) que é classificado em duas variantes, GHS-R1a e GHS-R1b. O efeito da grelina na secreção de GH inicia com a sua ligação ao receptor GHS-R1a nas células somatotróficas da pituitária, ativando-o (MALAGO'N et al., 2003), simultaneamente ao aumento da secreção de GHRH e à diminuição de somatostatina pelos neurônios hipotalâmicos. Isto é demonstrado com a administração de grelina exógena que inicia um rápido, forte e dose-dependente aumento na secreção de GH. Por outro lado, alta dose de GH exógeno diminui os níveis de grelina, reforçando a hipótese que ocorre um feedback que inibe a secreção de grelina na presença de GH. A expressão de RNAm de GHS-R1 é inibida pelo GH e IGF-I e aumentada pelo GHRH (VESTERGAARD et al., 2007).

O fato de ser produzida no estômago e o GHS-R1a ser vastamente expresso não apenas na pituitária, mas também no hipotálamo, fomentaram a hipótese de que, além de secretagogo do GH, a grelina poderia estar relacionada ao controle da fome, consumo alimentar e balanço energético (WILLESEN et al., 1999; ASAKAWA et al., 2001). O GHS-R1 é, ainda, expresso em áreas do sistema nervoso central que afetam ritmos biológicos, cognição, disposição, memória e aprendizado. Nos tecidos periféricos o GHS-R1a é encontrado no estômago, intestino, pâncreas, tireóide, gônadas, adrenal, fígado, ossos, coração e sistema vascular, podendo ser futuramente encontradas outras funções para a grelina (VAN DER LELY et al., 2004; HOSODA et al., 2006; KOJIMA; KANGAWA, 2006; DAVENPORT et al., 2005; KOJIMA et al., 2005; TRITOS; KOKKOTOU, 2006; ROCHA-SOUSA et al., 2006; GNANAPAVAN et al., 2002).

No que se refere à regulação da fome e peso corporal, a grelina tem função na fome pré-refeições. A infusão de grelina estimula em animais e humanos a ingestão espontânea de alimento (LAWRENCE et al., 2002; WREN et al., 2001). Além destas importantes funções, os níveis de grelina correlacionam-se inversamente as alterações no peso corporal (CUMMINGS et al., 2002), diminuem o gasto energético (YASUDA et al., 2003), lipólise (BARAZZONI et al., 2005), apoptose de adipócitos (KIM et al., 2004), atividade do sistema nervoso simpático (YASUDA et al., 2003), temperatura corporal (TSUBONE et al., 2005), produção de citosinas pró-inflamatórias (DIXIT et al., 2004) e atividade locomotora (TANG-CHRISTENSEN et al., 2004).

Recentes pesquisas também demonstraram os efeitos da grelina no metabolismo de glicose e lipídeos. A grelina tem efeitos hiperglicêmicos estimulando a produção hepática de glicose e gliconeogênese (MURATA et al., 2002). A glicose e insulina, por outro lado, influenciam negativamente a secreção de grelina (SHIYA et al., 2002).

As ações da grelina podem ser reguladas por: I) expressão e secreção de grelina; II) expressão do receptor; III) alterações na sensibilidade do receptor à grelina.

Determinados hormônios e substâncias como a insulina (FLANAGAN et al., 2003), GH (QI et al., 2003), IGF-I (GRINSPOON et al., 2004), testosterona

(PAGOTTO et al., 2003) afetam as concentrações de grelina circulante. Assim também, condições clínicas como diabetes mellitus tipos 1 e 2 podem contribuir para alterar estas concentrações (CELI et al., 2005; POYKKO et al., 2003). A regulação da expressão de GHS-R1a também apresenta uma função chave nas ações da grelina nos tecidos alvos. A expressão de GHS-R1a pode ser inibida pelo GH, IGF-I (KAMEGAI et al., 2005) e leptina (NOGUEIRA et al., 2004) e aumentada pelo GHRH (KINEMAN et al., 1999).

Além desses fatores, a concentração de grelina circulante é responsiva ao desbalanço energético agudo ou crônico, como aumento pré-prandial e diminuição pós-prandial, tendo picos de secreção precedendo a ingestão alimentar e na privação alimentar durante a noite (CUMMINGS et al., 2004; TOLLE et al., 2002; CUMMINGS et al., 2001). Os mecanismos de regulação pré-prandial da grelina provavelmente são disparados pelo SNC (MUNDINGER et al., 2006) enquanto a intensidade e duração da supressão da concentração de grelina está relacionado ao número de calorias ingeridas e tipo de alimento, sendo os lipídeos menos eficazes que carboidratos ou proteínas (OVERDUIN et al., 2005).

3.4 GRELINA E EXERCÍCIO FÍSICO

Os efeitos do exercício físico nas concentrações de grelina têm sido estudados recentemente. Um estudo interessante, realizado por Dall e colegas (2002) demonstrou que o exercício submáximo predominantemente aeróbio foi suficiente para aumentar a secreção de GH em sujeitos saudáveis, mas insuficiente para sujeitos com produção deficiente de GH. Em ambos os grupos, contudo, as concentrações plasmáticas de grelina não sofreram alterações. Este resultado pode indicar ainda que a grelina pode não estar envolvida na estimulação da secreção de GH induzida pelo exercício.

Outros estudos também não encontraram alterações nos valores de grelina no exercício agudo em diferentes intensidades (SCHIMIDT et al., 2004;

POMERANTES et al., 2006; JURIMAE et al., 2007), enquanto outros autores demonstraram diminuição (GHANBARI-NIAKI et al., 2006; BROOM et al., 2007; VESTERGAARD et al., 2007).

Alguns estudos mais recentes têm buscado esclarecer as relações entre exercício físico crônico e grelina. Ebal (2007) e Ghanbari-Niaki (2009) com seus colaboradores demonstraram que o exercício físico crônico reduz os valores de grelina no sangue e músculo sóleo de ratos. Em humanos, o treinamento físico aeróbio aumentou os valores de grelina em mulheres obesas (FOSTER-SCHUBERT et al., 2005), mas não alterou este parâmetro nos estudos de Mompugo e colaboradores (2003). De forma relevante, Kraemer e Castracane (2007) em mini-revisão, e Leidy e colaboradores (2004) em artigo original apontam para outros fatores que podem estar diretamente relacionados a alterações na grelina em resposta ao exercício físico crônico, como alterações na massa corporal ou função reprodutiva.

A hiperfagia encontrada no diabetes experimental e os efeitos do treinamento físico nesta excessiva ingestão alimentar podem ser interessantes modelos para o estudo do comportamento da grelina e demais hormônios relacionados à fome como a leptina, visto que ambas estão ligadas à hiperfagia diabética (SINDELAR et al., 1999; ISHII et al., 2002).

3.5 LEPTINA, HIPERFAGIA DIABÉTICA E EXERCÍCIO FÍSICO

A leptina (do grego *leptos*, i.e. magro) é uma proteína com estrutura helicoidal similar a citosinas que foi descoberta em 1994 a partir do isolamento do gene *ob* (ZHANG et al., 1994). O local onde a expressão de leptina é mais abundante é o tecido adiposo. Porém, a leptina também é expressa pelo músculo esquelético, epitélio mamário, placenta e o cérebro (KRAEMER et al., 2002).

A princípio, a leptina foi identificada por sua habilidade em regular a fome e o peso corporal via hipotálamo, inibindo a formação de neuropeptídeos relacionados à

fome (JACOB et al., 1997; SPIEGELMAN; FLIER, 2001). Contudo, têm-se evidenciado outras funções importantes da leptina em diversos órgãos incluindo placenta, ovários, músculo esquelético e estômago (HARVEY, 2007).

O nível de RNAm no tecido adiposo e da concentração sanguínea de leptina variam em determinados quadros patológicos. Estudos realizados envolvendo diabetes tipo 1 apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de leptina, o que contribui para hiperfagia diabética (SINDELAR et al., 1999).

A insulina e a leptina são secretadas em proporção aos estoques de gordura e ingestão alimentar. A deficiência de insulina (diabetes) e leptina (ratos ob/ob) são associadas com marcada hiperfagia, característica clínica do diabetes (SINDELAR et al., 1999). A secreção de leptina é dependente da estimulação da insulina no adipócito (HAVEEL et al., 1998). Assim, no diabetes induzido por drogas como a STZ foram observadas diminuições nas concentrações de leptina, podendo este fato estar relacionado à redução no transporte de glicose no tecido adiposo, o que pode contribuir para diminuição na produção de leptina (HAVEEL et al., 1998). Desta forma, as concentrações plasmáticas de leptina estão relacionadas positivamente aos índices de secreção de insulina e negativamente à sensibilidade à insulina (LARSON et al., 1996). Estudos têm demonstrado que a leptina tem efeito hipoglicemiante podendo contribuir na prevenção e terapia diabética (OGAWA et al., 1999; IDAKA, 2002).

A relação entre eixo GH-IGF-I e a leptina ainda é incerta. Alguns estudos demonstraram que a leptina regula a secreção de GH em roedores (CARRO et al., 1999; TANNENBAUM et al., 1998; VUAGNAT et al., 1998; LAPAGLIA et al., 1998) e que a deficiência de GH aumenta a concentração sérica de leptina proporcionalmente a taxa de gordura corporal (MARZULO et al., 2002).

Estudos demonstraram que o IGF-I exógeno pode reduzir a expressão de leptina no tecido adiposo (BONI-SCHNETZLER et al., 1999; YAMAZA et al., 2007) não sendo possível, contudo, afirmar que a expressão de RNAm de leptina seja controlada pelo IGF-I (HOUSEKNECHT et al., 2000). Um estudo interessante realizado em ratos com ausência total da produção de IGF-I hepático (IGF-I *knockout*) apresentou que neste modelo experimental os animais têm níveis maiores

de leptinemia, aproximadamente o dobro da concentração desse hormônio no sangue (SJROGREN et al., 2001).

A expressão de RNAm e a concentração sérica de leptina são influenciadas por determinados fatores ambientais. Entre estes fatores estão a exposição ao frio, o jejum e o exercício físico. O exercício físico parece agir como regulador da leptina, contudo os resultados até o momento são controversos. Alguns autores relatam não haver alteração após exercício agudo ou treinamento, enquanto outros apontam diminuição nos valores séricos e teciduais de leptina.

Mota e Zanesco (2007), após revisão da literatura, concluíram que os estudos que têm investigado os efeitos do exercício físico na leptina ainda não apontam uma resposta clara. As razões para isto são os diferentes protocolos de exercício físico e diferenças genéticas quando os estudos são realizados com humanos, pois polimorfismos em alguns genes acarretam diferentes respostas frente ao exercício.

Em estudos envolvendo exercício crônico alguns autores não encontraram diferenças significativas (DIRLEWANGER et al., 1997; PÉRUSSE et al., 1997; MORAES et al., 2005), enquanto outros encontraram redução tanto em humanos (PASMAN et al., 1998; RESELAND et al., 2001) quanto em ratos (JEN et al., 2003; ESTADELLA et al., 2004) após treinamento físico, bem como reversão parcial da resistência a leptina induzida pela dieta hiperlipídica (STEINBERG et al., 2004).

O estudo dos efeitos do treinamento físico na hiperfagia diabética, bem como nos hormônios grelina e leptina, podem contribuir para esclarecer esta relação e apontar vias pelas quais o exercício físico pode contribuir para melhoria do quadro diabético sendo a hiperfagia um de seus principais aspectos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para desenvolver este estudo, foram utilizados cerca de 110 ratos adultos da linhagem *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus Wistar)* com aproximadamente 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu e mantidos no biotério do laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro-SP. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (3-4 ratos por gaiola), mantidos à temperatura controlada de 25° C e fotoperíodo controlado de 12 horas claro/12 horas escuro e alimentados com ração balanceada padrão Purina® e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos utilizados neste trabalho seguiram as determinações éticas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté (CEE/UNITAU nº 025/08), sob protocolo nº 026/2005.

4.1 INDUÇÃO DO DIABETES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos foram anestesiados moderadamente com éter etílico e, em seguida, receberam aloxana monoidratada Sigma® (32 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. Em seguida, os animais foram recolocados nas gaiolas e receberam durante o primeiro dia após a aloxana, uma solução de água e glicose (15%), além de ração (LUCIANO; LIMA, 1997). Sete dias após a administração da droga, foi realizado teste de glicemia (Kit comercial- Laborlab® método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase) para comprovação do estado diabético dos animais. Foram considerados diabéticos apenas aqueles que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL.

Após estes procedimentos, foi registrada a massa corporal dos animais para serem distribuídos nos grupos sedentários e treinados conforme a massa corporal para animais controles e glicemia e massa corporal para animais diabéticos, com objetivo de obter igual distribuição dos animais nos grupos baseada nestes parâmetros.

Desta forma, os animais foram distribuídos nos grupos:

Controle Sedentário (CS) - ratos controles que não foram submetidos ao protocolo de exercícios físicos (n=10);

Controle Treinado (CT)- ratos controles que foram submetidos ao protocolo de exercícios físicos(n=9);

Diabético Sedentário (DS) - ratos diabéticos aloxânicos que não foram submetidos ao protocolo de exercícios físicos(n=10);

Diabético Treinado (DT) - ratos diabéticos aloxânicos que foram submetidos ao mesmo protocolo de exercícios físicos do grupo controle treinado (n=9).

4.2 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO

Antes de iniciar o treinamento físico, os animais foram submetidos a um período adaptativo para reduzir a resposta à situação estressora e adaptá-la ao exercício físico de natação.

Todos os ratos que participaram do treinamento físico foram submetidos a testes de esforço para a identificação da máxima fase estável de lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios com cargas constantes. Segundo Heck e colaboradores (1985) sua determinação tem se mostrado útil na prescrição de exercícios e na avaliação do condicionamento aeróbio. Gobatto seus colaboradores (2001) descreveram um protocolo para a determinação da MFEL para

ratos durante exercício de natação, que foi utilizado no presente estudo. Em síntese, os animais foram submetidos a uma série de testes de natação suportando sobrecargas constantes em relação ao peso corporal. Estas cargas foram crescentes entre os testes até que não fosse mais possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício. No presente estudo, cada teste consistiu de 30 minutos de natação contínua suportando uma carga, com coleta de sangue, por corte na extremidade da cauda a cada 5 minutos para a determinação das concentrações de lactato. Uma única incisão foi suficiente para obter as amostras, nas quais a concentração de lactato foi determinada em analisador de lactato. Houve intervalo de 48 horas entre os testes. O critério de estabilização empregado foi a diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 25 minutos de exercício.

A figura 2 apresenta os valores das porcentagens de peso corporal das cargas encontradas equivalentes à MFEL dos grupos controle e diabético. Houve diferença entre os grupos ($P<0,05$).

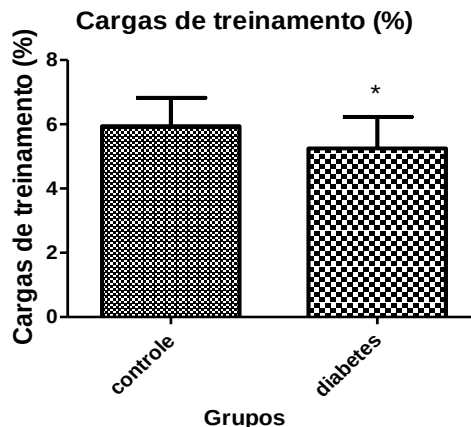


Figura 2. Cargas em porcentagem do peso corporal correspondentes à MFEL dos animais controles e diabéticos ($P<0,05$ - teste de Mann Whitney).

Após a determinação da MFEL, foi iniciado o protocolo de treinamento que consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas, suportando sobrecarga equivalente à 90% da MFEL determinada de forma individual.

As sessões de natação foram realizadas em recipiente de amianto com 100 centímetros (cm) de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. Os recipientes foram preenchidos com água numa profundidade de 40 cm, de tal forma que os animais não pudessem apoiar a cauda no fundo do tanque. A temperatura da água foi controlada por meio de um aquecedor elétrico, sendo mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício (AZEVEDO, 1994).

Um teste agudo (25 minutos suportando uma carga equivalente a 90% da MFEL) foi realizado na sétima semana para confirmar a eficácia do treinamento físico. Neste teste agudo as concentrações de lactato ao repouso e após 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de exercício foram analisados (tabela 1). Neste parâmetro, os animais treinados tiveram valores de lactato menores que os animais não treinados.

Tabela 1 – Concentração de lactato (mmol/l) durante os 25 minutos de exercício físico agudo com carga equivalente a 90% da MFEL

Lactato durante o exercício	Grupos	0	5	10	15	20	25
	CS	1,5±0,5	4,7±1,5	7±0,6	7,5±1,3	8,3±0,9	8,5±0,4
	CT	1±0,1	4,1±1,1	6,1±0,5 ^a	5,9±1,4	6,2±1 ^a	5,5±1,7 ^a
	DS	1,5±0,7	4,8±1,2	6,5±0,9	6,9±1,1	8,1±0,5 ^b	8,1±1,5 ^b
	DT	1,4±1,7	4,2±1,5	5,5±1 ^a	5,1±1,3	5,9±0,9 ^{a,c}	5,3±1,3 ^{a,c}

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. a $\neq$ de CS; b $\neq$ de CT; b $\neq$ de DS. (ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$).

4.3 AVALIAÇÕES PRÉVIAS AO SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Durante o período experimental, foram registrados semanalmente os valores de massa corporal, ingestão alimentar e hídrica para posterior análise. Com o mesmo objetivo, ao final do experimento foram coletados o comprimento e massa corporal dos animais. Os resultados de ingestão alimentar e hídrica foram registrados por gaiola e apresentados em gramas ou mililitros ingeridos por quilo de rato, proporcionalmente a soma das massas dos animais mantidos na gaiola. Foram também realizadas avaliações de glicemia para confirmação do diabetes.

4.4 AVALIAÇÕES APÓS O SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Ao final do período experimental, os animais foram mantidos em repouso por 48 horas após a última sessão de exercícios, sem jejum prévio. Após a eutanásia, ocorrida com prévia anestesia em câmara de gás carbônico (CO₂) e posterior decapitação, o sangue foi coletado e posteriormente centrifugado a 3000 rotações por minutos (RPM) por 10 minutos. Do soro foram realizadas as seguintes análises:

- Glicemia: A concentração de glicose sérica foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase através de kit comercial (Laborlab[®]) (HENRY, 1974).

- Insulinemia: Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado método de radioimunoensaio (RIA) - Kit Coat-A-Count da Diagnostic Products Corporation (DPC) de fase sólida.

Albuminemia: A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol lido em espectrofotômetro (HENRY, 1974)

Trigliceridemia: foi determinada pelo método enzimático- colorimétrico através do kit triglicerídeos GPO-PAP (Laborlab) e lido em espectrofotômetro.

O sangue também foi coletado para as seguintes análises:

- GH: Foi determinado pelo método de RIA pela técnica duplo anticorpo/PEG utilizando kit comercial – (Rat Growth Hormone –Linco)
- IGF-I: Foi determinado pelo método de ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando kit comercial (DSL- Diagnostic Systems Laboratories).
- Leptina: Foi determinada pelo método de ELISA pela técnica *double-sandwich antibody* utilizando kit comercial (Mouse/Rat Leptin Enzyme Immunoassay Kit- Spibio-Cayman).
- Grelina: Após coleta de 500 µl de sangue em tubo contendo 5µl de ácido p-hidroximercuribenzóico (PHMB), este foi centrifugado e acrescido ácido clorídrico (HCL) ao sobrenadante. Após nova centrifugação o sobrenadante foi utilizado para determinação da grelina pelo método de ELISA pela técnica *double-sandwich antibody* utilizando kit comercial (Rat Acylated Ghrelin Enzyme Immunoassay Kit- Spibio-Cayman).
- Avaliações teciduais: O estômago foi retirado e pesado. Em seguida, foi lavado com soro fisiológico (NaCl-0,9%) e pesado novamente. Foram retiradas amostras dos seguintes tecidos: amostras do fígado para avaliação de proteína, DNA e IGF-I; do pâncreas para proteína, DNA e IGF-I; da hipófise para GH; do tecido adiposo branco para avaliação de proteína, DNA e leptina; e do fundo do estômago para avaliação de proteína, DNA e grelina.
- Proteínas: Foram obtidas pelo método proposto por LOWRY et al. (1951), sendo lidas em espectrofotômetro.
- DNA: Foi avaliado pelo método da difenilamina e lido em espectrofotômetro (GILES; MAYERS, 1965).
- Triglicerídeo (TG): As amostras foram sonicadas em tubos contendo tritonX-100 (0,1%) e o sobrenadante foi extraído para a determinação do TG pelo método enzimático- colorimétrico através do kit triglicerídeos GPO-PAP (Laborlab) e lido em espectrofotômetro (BELMONT, 2004).

- IGF-I tecidual: As amostras dos tecidos hepático e pancreático foram homogeneizadas e, em seguida, adicionado ácido acético (1M) na proporção 5 ml por grama de tecido. Após centrifugação do material foi realizada a extração por ácido acético. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante foi reconstituído por aminometano –HCL- buffer (pH 7.8), segundo proposto por D'ercole e colaboradores (1986). As concentrações do peptídeo IGF-I foram então obtidas pelo método de ELISA utilizando-se kit comercial.

- GH tecidual: A amostra da hipófise foi homogeneizada em polytron e a extração feita por ácido acético aminometano –HCL- buffer (pH 7.8) dos métodos de Dércole e colaboradores (1986) e Davalli e colaboradores (1999). As concentrações de GH foram determinadas pelo método de radioimunoensaio (RIA) (Rat Growth Hormone Ria Kit- Linco)

- Leptina tecidual: A amostra do tecido adiposo epididimal foi homogeneizada em polytron em buffer Krebs-Ringer suplementado com HEPES contendo 0,1mg/ml de fenilmetilsulfonilfluorido e 200 IU/ml de aprotinina. O homogenato foi centrifugado (10000/10 min). A dosagem foi feita pelo método de ELISA pela técnica *double-sandwich antibody* utilizando kit comercial (*Mouse/Rat Leptin Enzyme Immunoassay* Kit Spibio-Cayman) (ATTOUB et al., 1999).

- Grelina tecidual: A amostra da região do fundo do estômago foi pesada (aproximadamente 200 mg) e homogeneizada no polytron em tubo contendo 2 mL de solução HAc/HCl. O homogenato foi fervido (20 minutos) e centrifugado (3000 rpm/5min). O sobrenadante foi separado, neutralizado para pH 6,9. Em seguida, foi realizada a dosagem do hormônio pelo método de ELISA utilizando a técnica *double-sandwich antibody* utilizando kit comercial (*Rat Acylated Ghrelin Enzyme Immunoassay* Spibio-Cayman) (LEE et al., 2002).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade de Bartlett e, em seguida, os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste “*post-hoc*” de Bonferroni ou teste t com correção de Bonferroni quando necessário, para os valores que apresentaram normalidade e homocedasticidade. Para os demais valores foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os softwares *Statistica*[®] e GraphPad Prism[®] foram utilizados para os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

A tabela 2 e figura 3 apresentam os valores de massa e comprimento corporal ao final do período experimental e a diferença entre valores inicial (primeira semana) e final (última semana) da massa corporal. Nestes parâmetros, o diabetes causou redução e o treinamento físico não alterou estes valores nos animais controles nem nos animais diabéticos.

Tabela 2 - Massa corporal (g), diferença final-inicial da massa corporal (g) e comprimento corporal (cm) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros \ Grupos	CS	CT	DS	DT
Massa corporal	508±65	463±38	306±50 ^{a,b}	298±58 ^{a,b}
Diferença final-inicial da massa corporal	111±30	72±12	-12±74 ^{a,b}	-16±27 ^{a,b}
Comprimento	26,5±1,1	26,6±0,7	23,9±1 ^{a,b}	23,9±1,4 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT. (ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni; p<0,05).

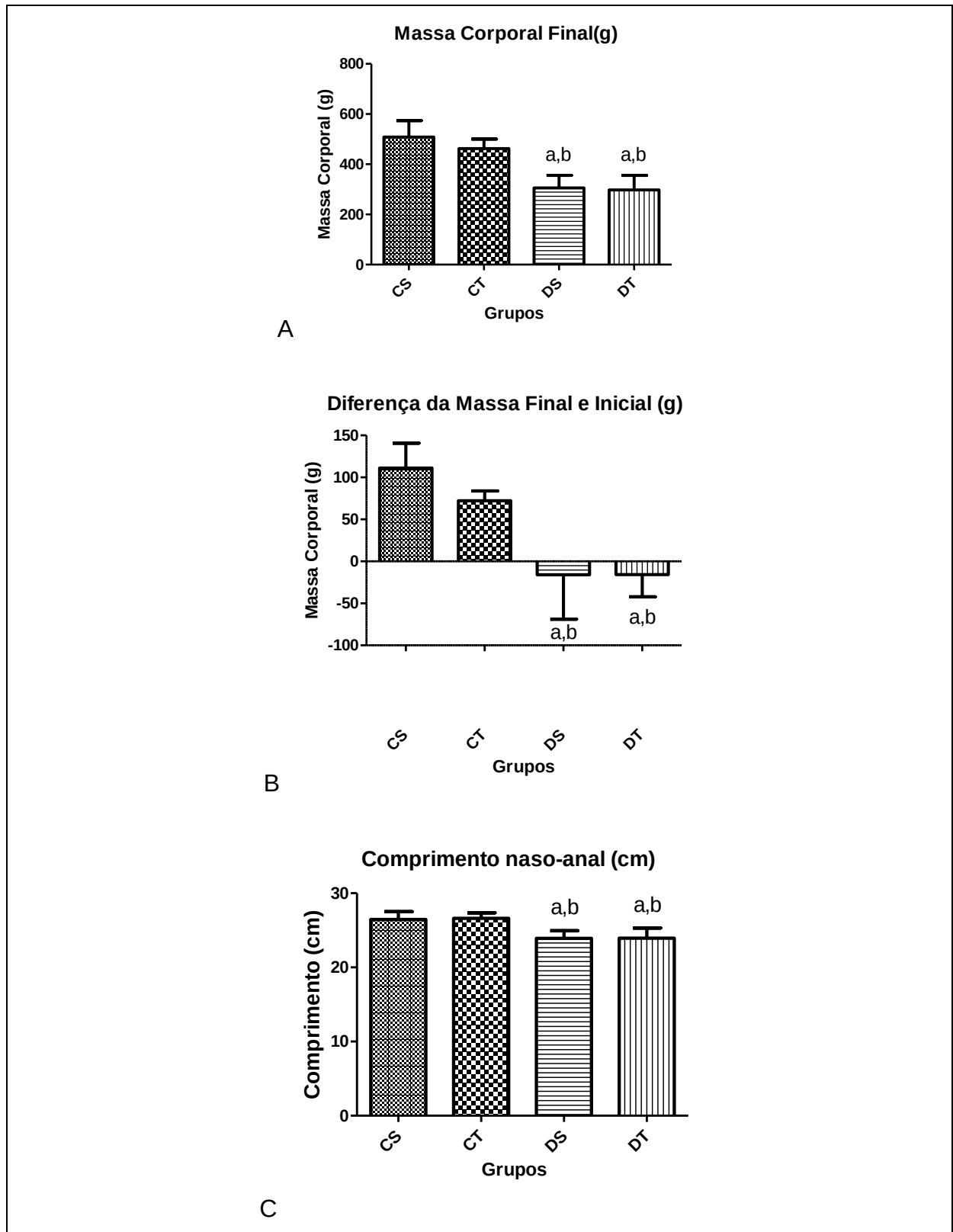


Figura 3. Valores de massa corporal final (A), diferença da massa final e inicial (B) e comprimento naso-anal (C) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). Em (A) e (C) os dados foram registrados no último dia das oito semanas do período experimental. Em (B), os dados foram registrados nas semanas inicial e final do período experimental. a $\neq$ CS e b $\neq$ CT. ANOVA, *Post hoc* de Bonferroni ($P < 0,05$).

As ingestões alimentar e hídrica foram aumentadas nos grupos diabéticos (DS e DT) comparados aos controles (CS e CT). Os animais diabéticos treinados ingeriram, em média, menores quantidades de comida que os diabéticos sedentários (tabela 3 e figura 4).

Tabela 3 - Valores médios de ingestão alimentar (g/kg de rato) e ingestão hídrica (ml/kg de rato) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) coletados semanalmente durante o período experimental.

Grupos	CS	CT	DS	DT
Parâmetros				
Ingestão alimentar	58,2±3,4	60,4±2,3	194,1±8,2 ^{a,b}	162,6±20,1 ^{a,b,c}
Ingestão hídrica	98,4±21,2	100,8±30,5	931,7±147,1 ^{a,b}	759,5±74,2 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS. (ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$).

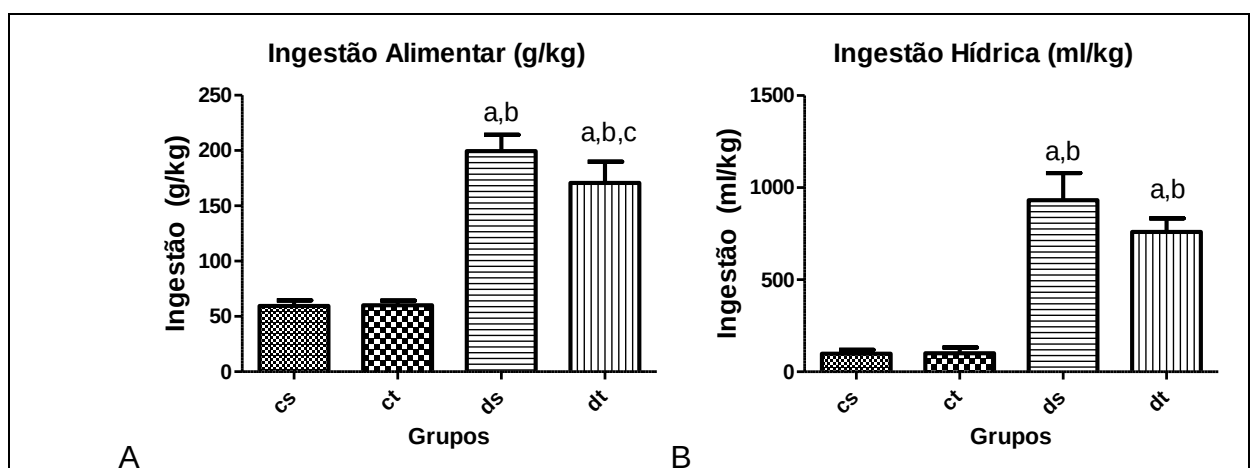


Figura 4. Valores médios de ingestão alimentar (A) e ingestão hídrica (B) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) coletados semanalmente durante o período experimental. a ≠ CS; b ≠ CT; c ≠ DS. (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

Os valores de glicemia e trigliceridemia foram aumentados nos animais diabéticos (DS e DT) e ambos foram reduzidos no grupo diabético treinado quando comparados aos valores do grupo diabético sedentário (tabela 3 e figuras 5B e 5C).

A tabela 4 e o gráfico 5A apresentam os valores de insulina sérica. A indução do diabetes reduziu estes valores nos animais de ambos os grupos (DS e DT) e o treinamento físico não alterou os valores deste parâmetro. A albumina sérica foi igual em todos os grupos, não sofrendo alterações nem pela indução da doença, nem pelo treinamento físico (tabela 3 e figura 5D).

Tabela 4 - Valores de insulinemia (ng/ml), glicemia (mg/dl), trigliceridemia (mg/dl) e albuminemia (g/dl) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros \ Grupos	CS	CT	DS	DT
Insulinemia	0,38±0,18	0,39±0,19	0,04±0,02 ^{a,b}	0,04±0,01 ^{a,b}
Glicemia	129,7±12,1	106,6±15,1	396,8±42,8 ^{a,b}	360,2±34,5 ^{a,b,c}
Trigliceridemia	97,7±17,3	121,7±12,9	238,2±38 ^{a,b}	189,3±61,6 ^{a,b,c}
Albuminemia	4,2±0,4	4,3±0,6	4±0,5	3,8±0,5

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ CS; b ≠ CT; c ≠ DS. (Para glicose, triglicerídeos e albumina: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; Para insulina: ANOVA, teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

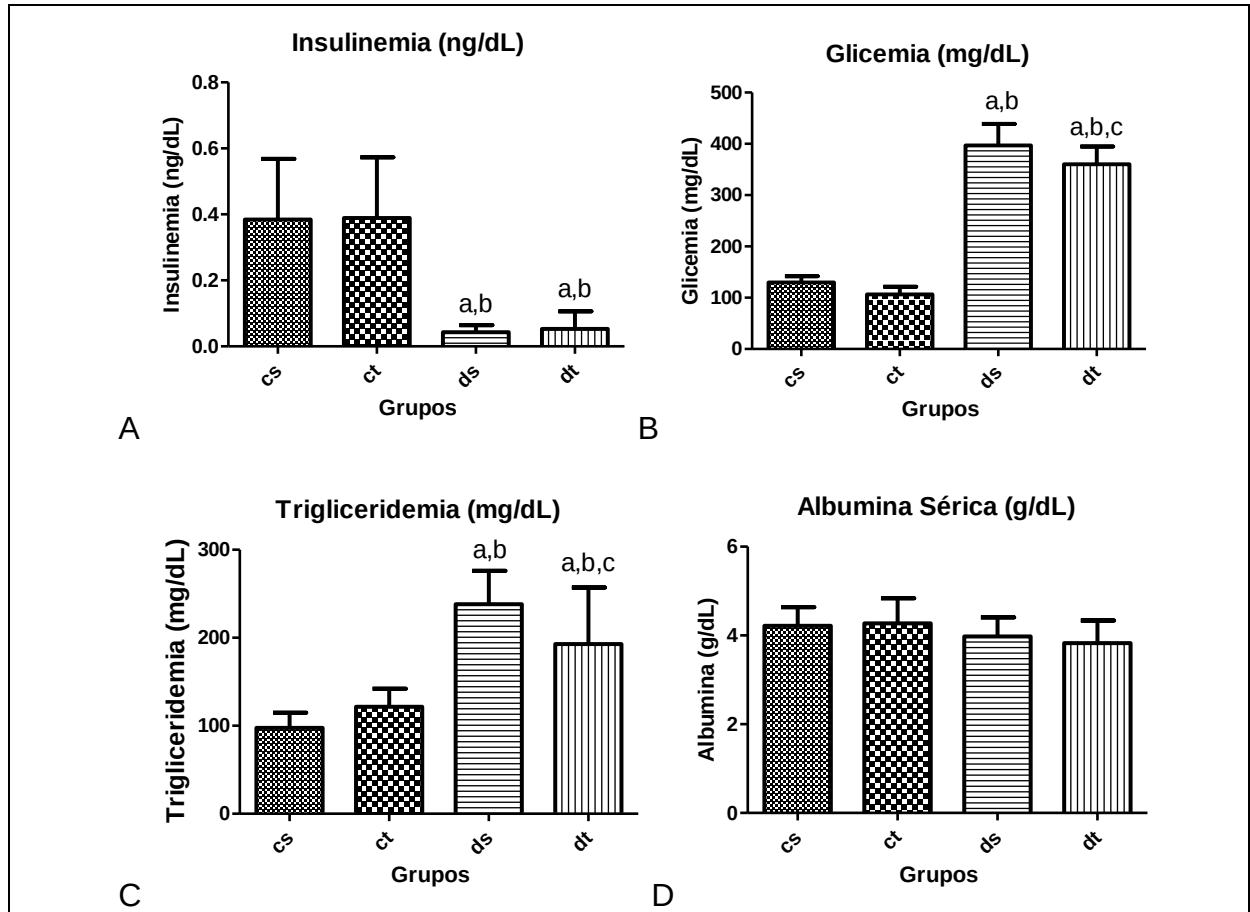


Figura 5. Valores de insulinemia (A), glicemia (B), trigliceridemia (C) e albuminemia (D) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a $\neq$ CS; b $\neq$ CT; c $\neq$ DS. (Para glicose, triglicerídeos e albumina: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; Para insulina: ANOVA, teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

O conteúdo de hormônio do crescimento (GH) sérico esteve reduzido nos grupos diabéticos sedentário e treinado, comparados ao grupo controle sedentário. Resposta semelhante foi encontrada no conteúdo de GH hipofisário (tabela 5 e figura 6).

Tabela 5 - Conteúdo de hormônio do crescimento (GH) sérico (ng/ml) e hipofisário (ng/mg) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Grupos	CS	CT	DS	DT
Parâmetros				
GH sérico	1,3±0,7	0,9±0,3	0,6±0,3 ^a	0,5±0,1 ^a
GH hipofisário	1,3±0,3	1,1±0,5	0,8±0,2 ^a	0,7±0,1 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

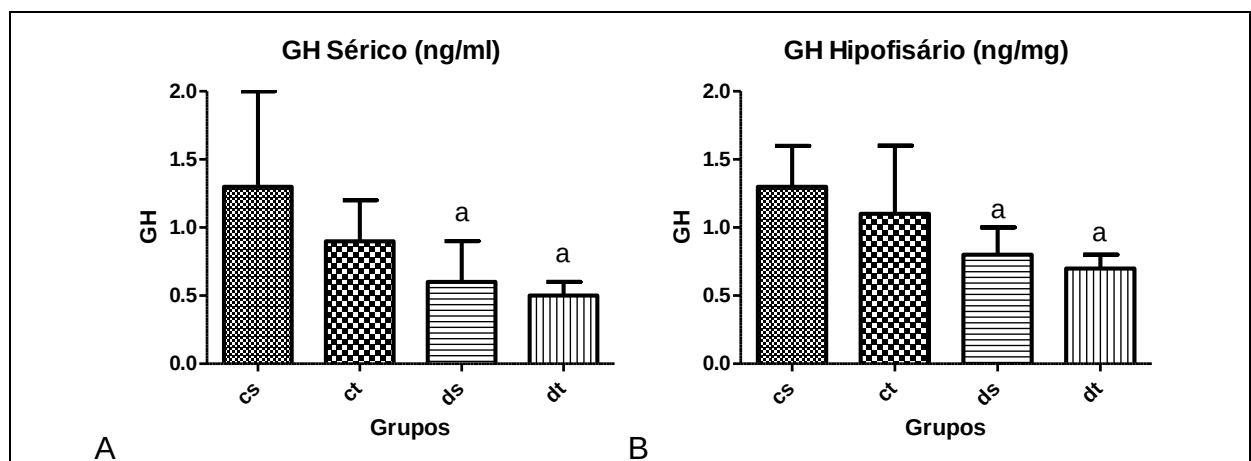


Figura 6. Valores de conteúdo de hormônio do crescimento (GH) sérico (A) e hipofisário (B) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a ≠ CS (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

As concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) foram analisadas no sangue, fígado e pâncreas. O IGF-I sérico e hepático esteve reduzido nos animais diabéticos sedentários comparados aos controles (CS e CT). Os animais diabéticos treinados, contudo, não apresentaram diferenças quando comparados aos demais grupos estudados (tabela 6 e figura 7).

O conteúdo de IGF-I pancreático diferiu do comportamento encontrado no sangue e fígado. Os valores deste parâmetro nos animais diabéticos treinados foram maiores que os demais grupos estudados. Os valores dos animais do grupo DS foram maiores comparados aos animais do grupo CT (tabela 6 e figura 7C).

Tabela 6 - Conteúdo de fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) sérico (ng/ml), hepático (ng/g) e pancreático (ng/g) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Grupos	CS	CT	DS	DT
Parâmetros				
IGF-I sérico	20,8±4,5	20,5±2,3	15,0±2,6 ^{a,b}	16,5±1,5
IGF-I hepático	43,7±3,6	39,7±7,4	32,7±5,6 ^a	36,5±3,9
IGF-I pancreático	26,2±17,1	15,5±9,9	37,2±20,3 ^b	62,3±38,3 ^{a,b,c}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS. (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

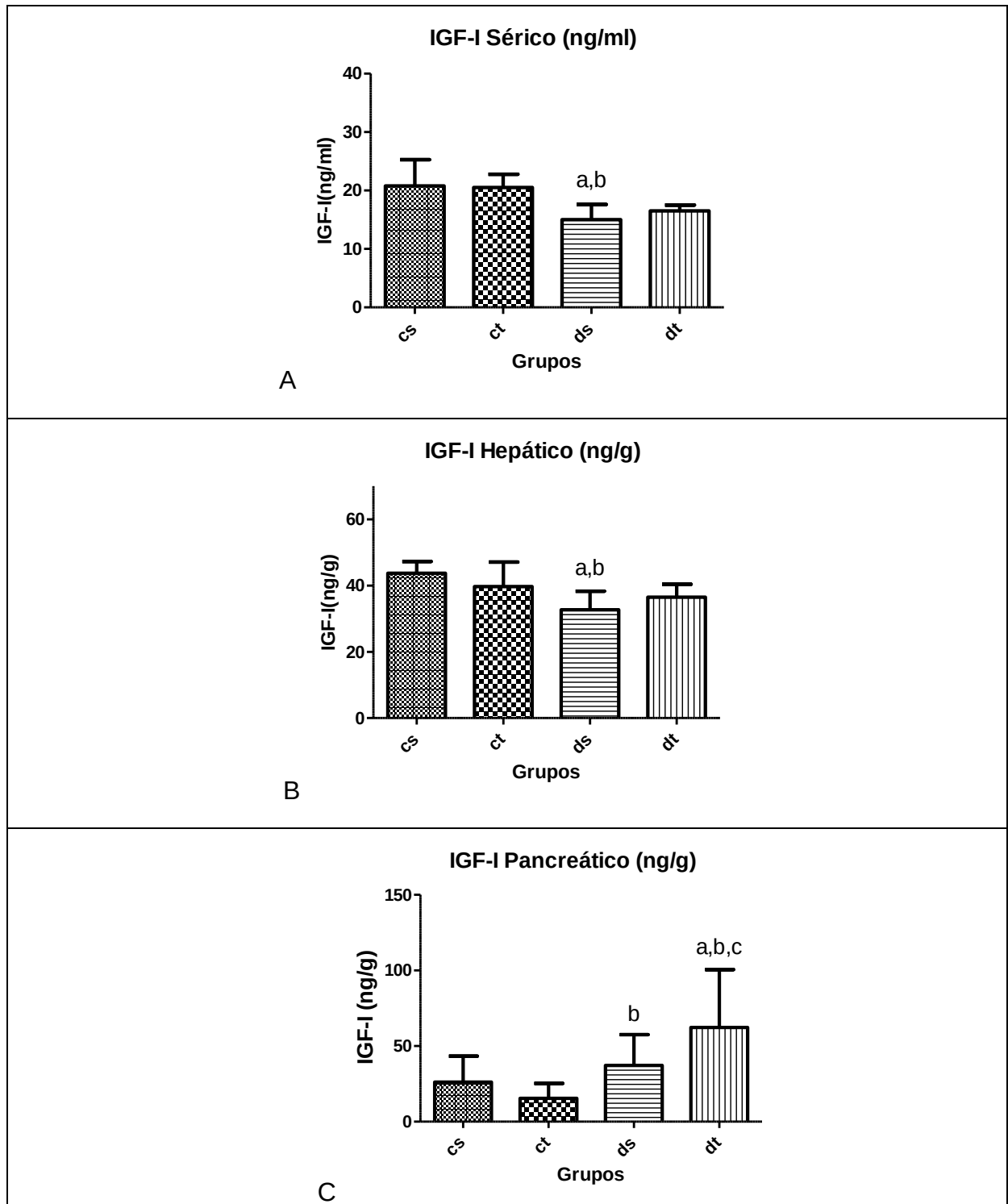


Figura 7. Conteúdo de fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) sérico (A), hepático (B) e pancreático (C) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a $\neq$ CS; b $\neq$ de CT; c $\neq$ de DS. (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

A tabela 7 e a figura 8 (A-D) apresentam valores relacionados a parâmetros hepáticos. A dosagem do conteúdo de proteínas no fígado, bem como a razão proteína/DNA demonstrou valores menores nos animais do grupo DS comparado aos controles para estes dois parâmetros. Os animais do grupo DT tiveram valores menores de razão proteína/DNA apenas quando comparados aos animais do grupo CT. Os valores de DNA não diferiram entre os grupos estudados (figura 8A-C).

Com relação aos valores de triglicerídeos hepáticos, os animais diabéticos sedentários tiveram, em média, valores menores que os animais dos grupos controles (CS e CT). O valor do grupo DT não foi diferente de nenhum dos grupos estudados (tabela 7 e gráfico 8D).

Tabela 7 - Valores hepáticos de proteína (mg/100mg), DNA (mg/100mg), razão proteína/DNA e triglicerídeos (mg/g) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros \ Grupos	CS	CT	DS	DT
Proteína hepática	4,4±0,4	4,9±0,7	3,6±0,5 ^{a,b}	4,2±0,6
DNA hepático	0,10±0,01	0,11±0,02	0,11±0,03	0,12±0,01
Razão proteína/DNA hepático	44,3±4,3	44,6±2,8	35±8,6 ^{a,b}	36,5±6,2 ^b
Triglicerídeos hepáticos	10±3	10,1±2,7	15±2,9 ^{a,b}	12,1±4,1

Valores expressos como média ± desvio padrão. a.≠ de CS; b.≠ de CT; (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p<0,05$).

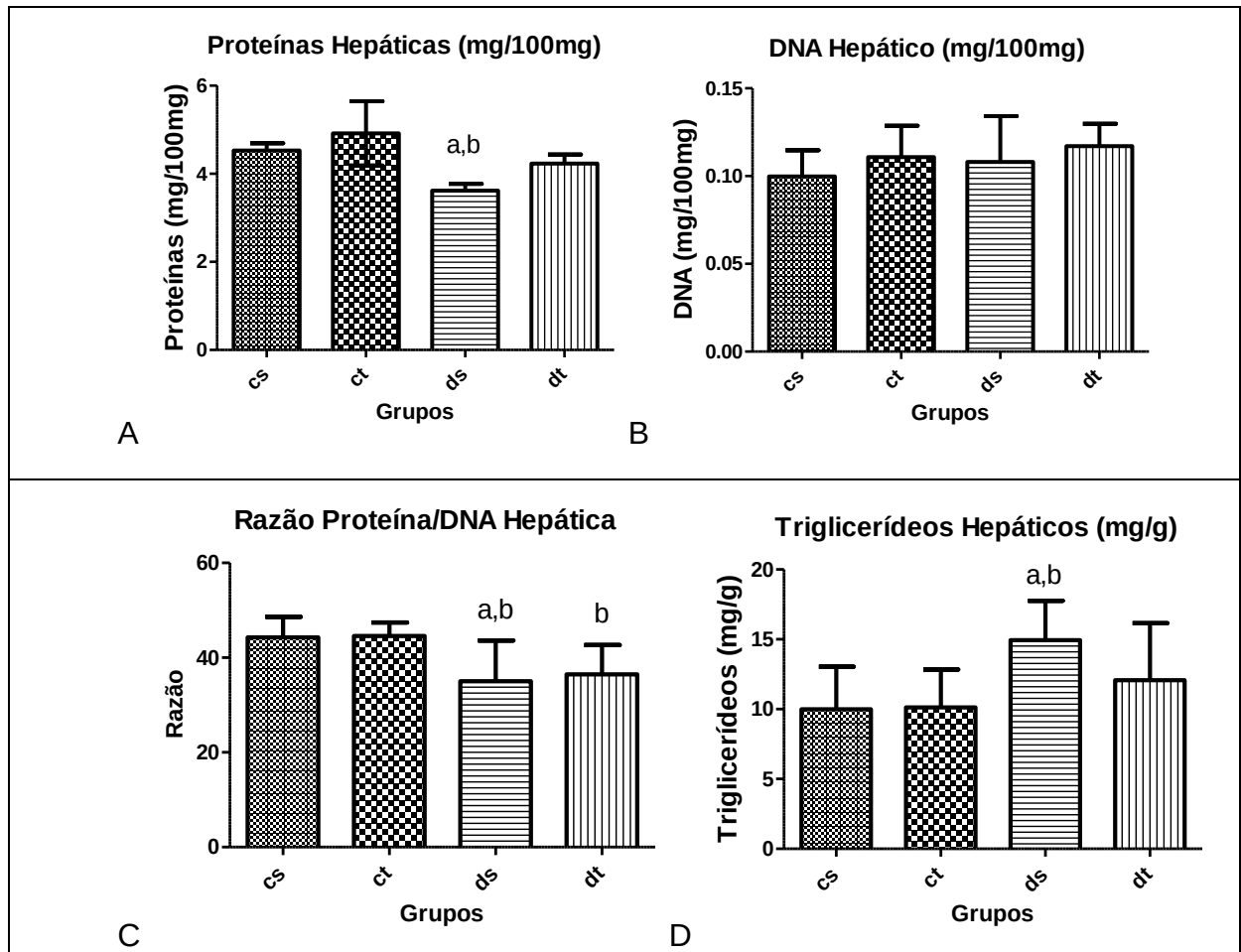


Figura 8. Valores de proteína (A), DNA (B), razão proteína/DNA (C) e triglicerídeos (D) no fígado dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a $\neq$ CS; b $\neq$ CT. (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

Ao avaliar os parâmetros de proteína, DNA e a razão destes no pâncreas foram encontrados os valores apresentados na tabela 8 e figura 9. Os grupos estudados não tiveram valores diferentes de proteína. O grupo diabético sedentário, contudo, apresentou valor maior de DNA pancreático que os grupos controle treinado e diabético treinado, enquanto nos valores de razão proteína/DNA apenas o valor do grupo DT foi maior que o DS.

Tabela 8 - Valores pancreáticos de proteína (mg/100mg), DNA (mg/100mg) e razão proteína/DNA dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros \ Grupos	CS	CT	DS	DT
Proteína pancreática	12,9±3,8	15,8±4,3	13,1±3,8	13,8±3,5
DNA pancreático	0,2±0,08	0,19±0,04	0,28±0,06 ^b	0,17±0,03 ^c
Razão proteína/DNA pancreática	67,6±11,8	66,7±14,2	48±14,3	86,3±18,1 ^c

Valores expressos como média ± desvio padrão. b ≠ de CT; c ≠ de DS (Para DNA: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; para proteína e razão proteína/DNA; teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

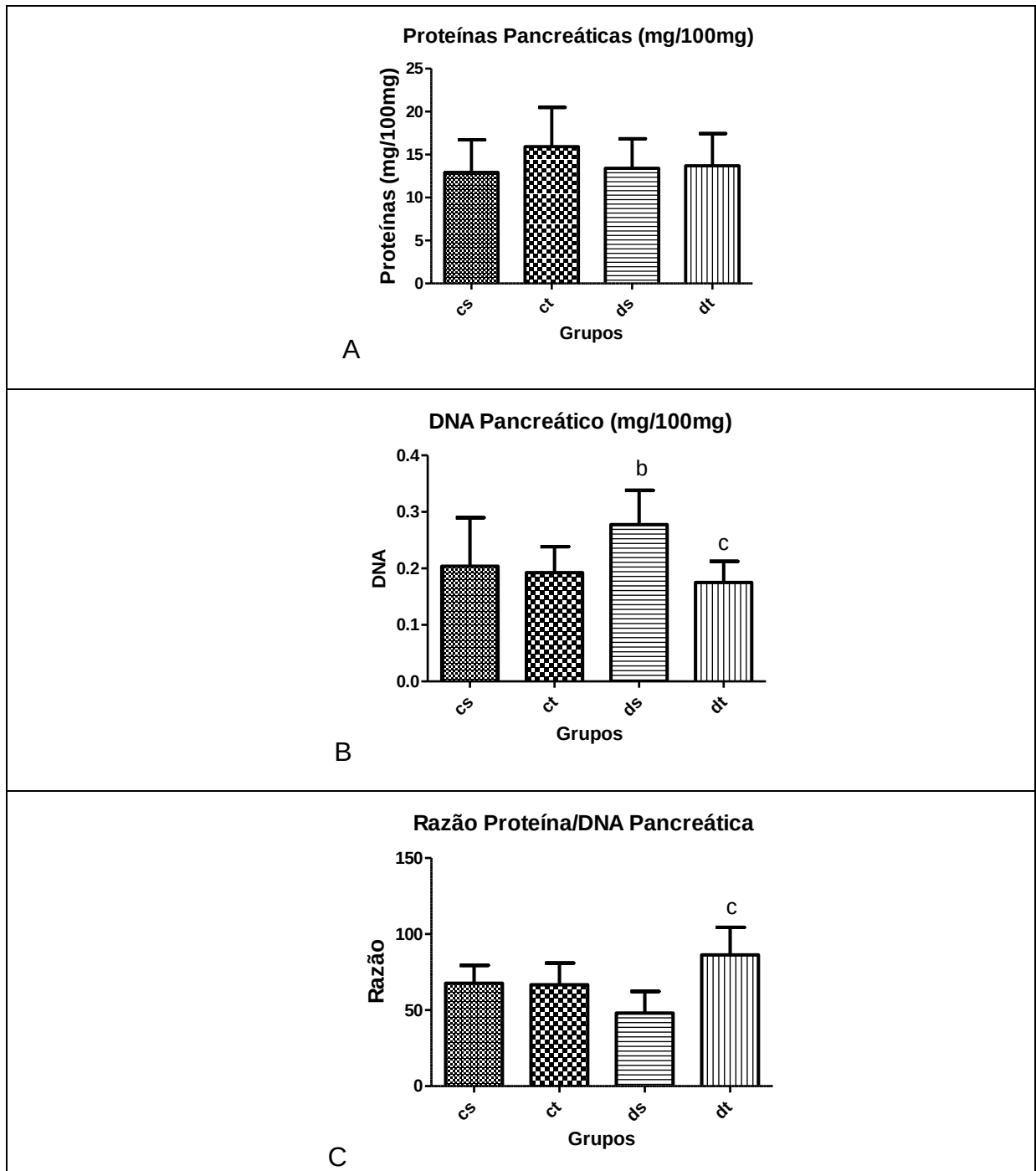


Figura 9. Valores pancreáticos de proteína (A), DNA (B) e razão proteína/DNA (C) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. b $\neq$ de CT; c $\neq$ de DS (Para DNA: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; para proteína e razão proteína/DNA; teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

Na tabela 9 e figura 10 (A e B), podem ser observados os valores de grelina plasmática e gástrica. Os valores de grelinemia dos animais diabéticos (DS e DT) foram maiores que dos animais dos grupos controles (CS e CT). O conteúdo de grelina gástrica fúndica foi aumentado pelo diabetes, mas diminuído pelo treinamento físico apenas nos animais diabéticos.

Tabela 9 - Conteúdo de grelina no sangue (pg/ml) e no estômago (pg/mg) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros	Grupos	CS	CT	DS	DT
Grelina plasmática		55,1±48,4	61,3±49,6	133,9±90,4 ^{a,b}	139,9±62,1 ^{a,b}
Grelina tecidual		299,8±74,1	308,1±83,4	433,5±115,3 ^{a,b}	303,7±73,9 ^c

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS. (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

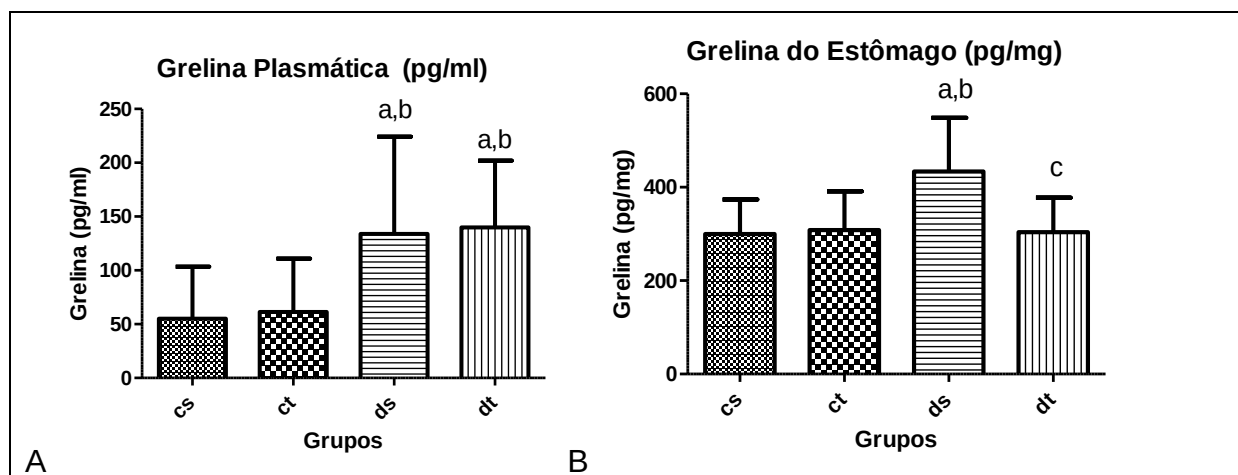


Figura 10. Conteúdo de grelina no sangue (A) e no estômago (B) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS. (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Buscando esclarecer possíveis alterações no estômago causadas pelo diabetes ou treinamento físico, foram analisados os teores de proteína, DNA e a razão destes. Os valores do conteúdo de proteína foram reduzidos nos grupos DS e DT comparados ao CT e no grupo DT comparado ao CS. O teor de DNA no estômago dos animais diabéticos (DS e DT) foram menores comparados aos controles (CS e CT) e a razão proteína DNA foram maiores no grupo CT comparado aos grupos CS e DT. Estes dados estão apresentados na tabela 10 e figura 11 (A-C).

Tabela 10 - Conteúdo de proteína (mg/100mg), DNA (mg/100mg) e razão proteína/DNA do estômago dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros	CS	CT	DS	DT
Proteínas do estômago	3±0,7	3,8±0,8	2,7±0,4 ^b	2,2±0,4 ^{a,b}
DNA do estômago	0,1±0,02	0,1±0,02	0,08±0,01 ^{a,b}	0,08±0,01 ^{a,b}
Razão proteína/DNA do estômago	29,2±6,8	36,1±3,8 ^a	34,4±4,1	28,4±3 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni p<0,05).

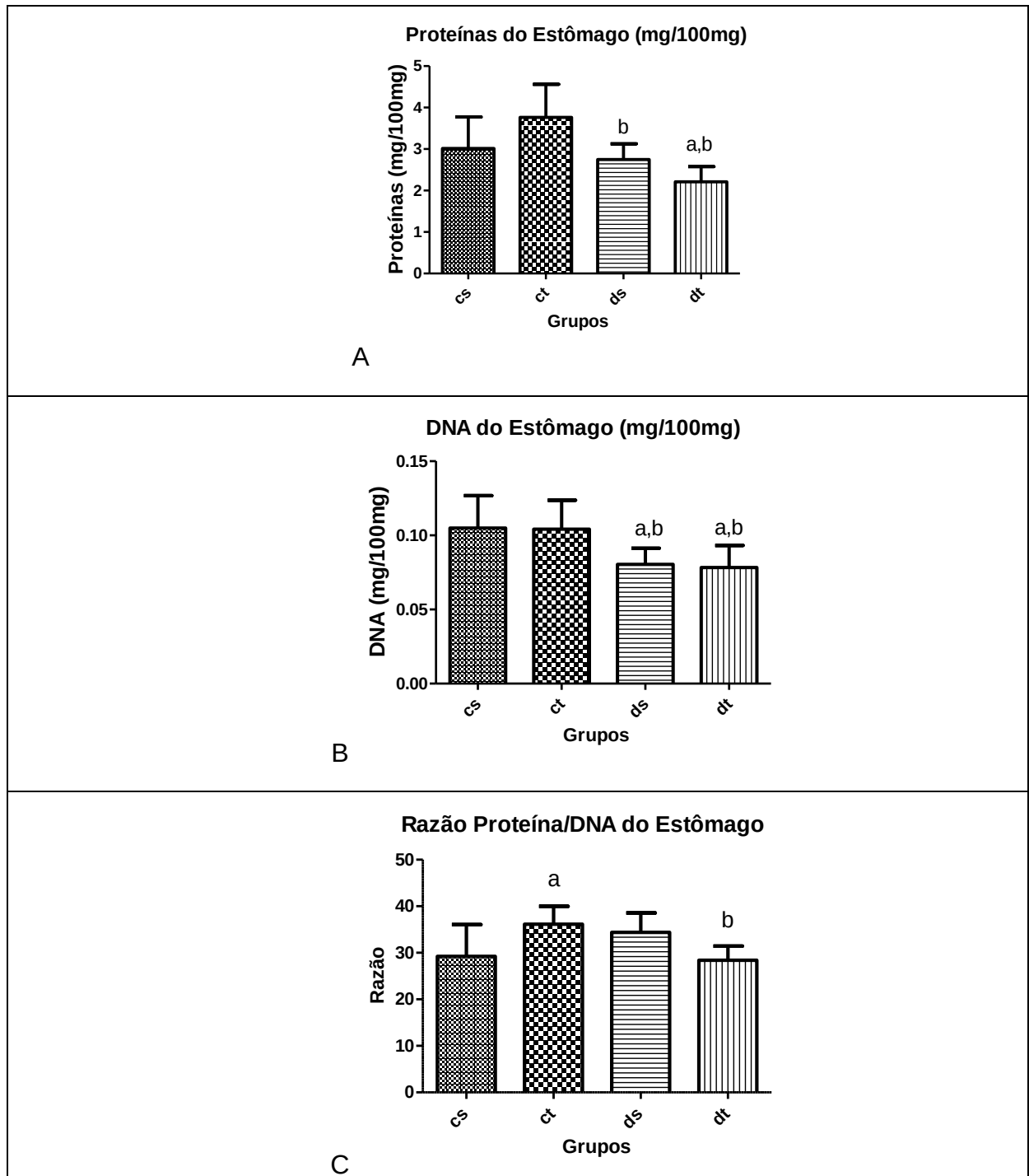


Figura 11. Conteúdo de proteína (A), DNA (B) e razão proteína/DNA (C) do estômago dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a ≠ de CS; b ≠ de CT; (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$).

Os valores de massa do estômago com conteúdo (total) e sem conteúdo (vazio), bem como a massa do conteúdo gástrico estão apresentados na tabela 11 e figura 12. Quando analisadas a massa total do estômago e do conteúdo gástrico observamos que os animais diabéticos sedentários tiveram valores maiores que os demais grupos estudados. Quando fora retirado o conteúdo gástrico, a massa do estômago vazio dos animais diabéticos sedentários também foi maior, quando comparados aos demais grupos estudados. Com relação a massa do estômago vazio, o grupo DT também teve valores maiores que os grupos CT e CS.

Tabela 11 - Massa total do estômago (g), massa do estômago vazio (g) e massa do conteúdo gástrico (g) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros \ Grupos	CS	CT	DS	DT
Massa total do estômago	5,6±2,2	5,9±2,8	12,4±4,8 ^{a,b}	7,75±3,1 ^c
Massa do estômago vazio	2±0,3	1,8±0,2	2,4±0,2 ^{a,b}	2,1±0,3 ^{a,b,c}
Massa do conteúdo gástrico	3,6±2,2	4,1±2,7	10,1±4,7 ^{a,b}	5,7±3 ^c

Valores expressos como média ± desvio padrão. a.≠ de CS; b.≠ de CT; c.≠ de DS. (Para massa total e conteúdo gástrico: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p<0,05$; para massa do estômago vazio: teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, $p<0,05$).

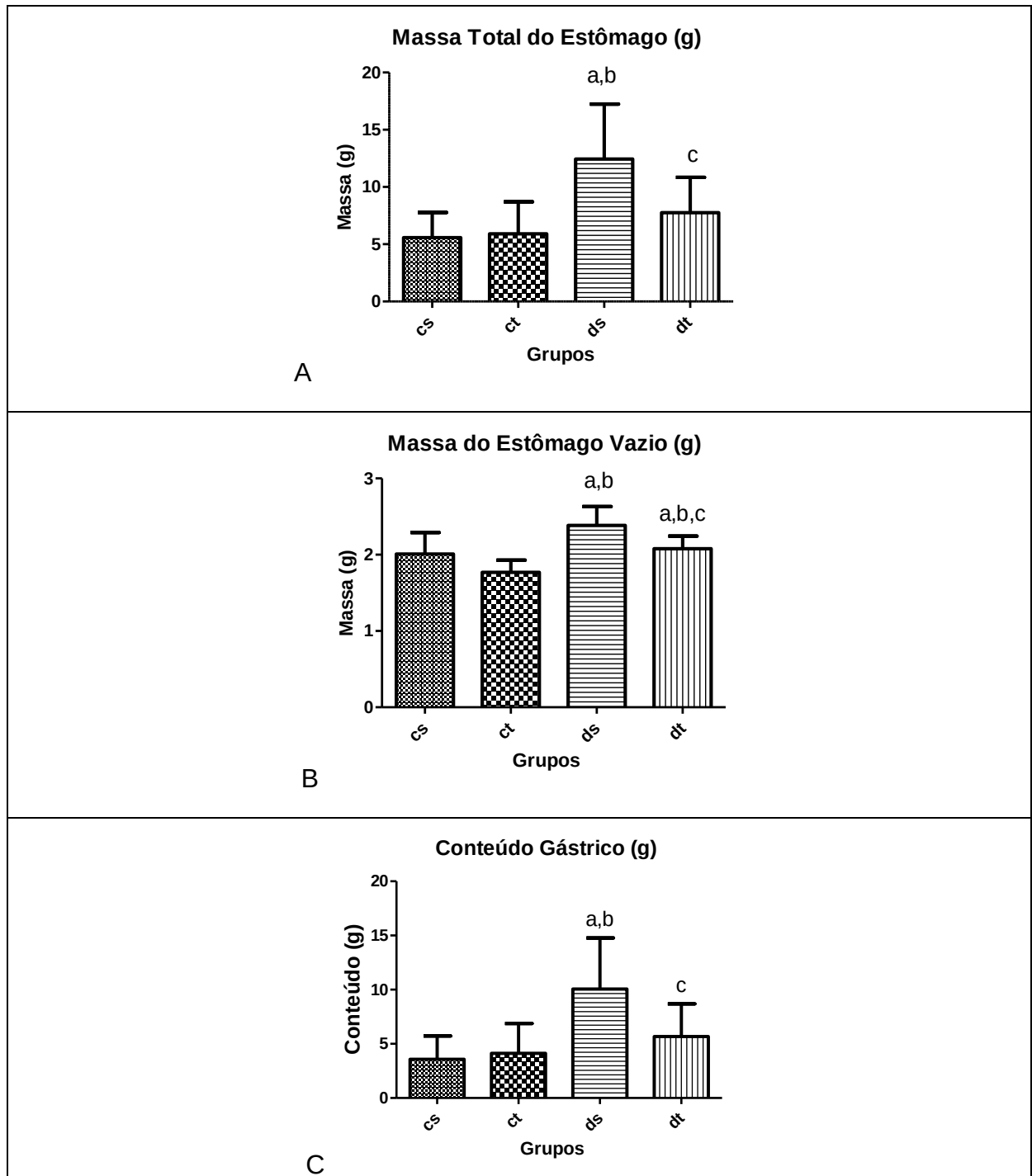


Figura 12. Massa total do estômago (A), massa do estômago vazio (B) e massa do conteúdo gástrico (C) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a $\neq$ de CS; b $\neq$ de CT; c $\neq$ de DS. (Para massa total e conteúdo gástrico: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; para massa do estômago vazio: teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA, $p < 0,05$).

Os valores de leptina estão apresentados na tabela 12 e figura 13. A leptinemia foi reduzida pelo diabetes em ambos os grupos diabéticos (DS e DT) e o treinamento físico não alterou estes valores nos animais diabéticos, apesar de reduzir nos animais controles (CT<CS). Por outro lado, o conteúdo de leptina no tecido adiposo epididimal dos animais diabéticos sedentários foi reduzido comparado ao grupo controle sedentário. Interessante que o grupo diabético treinado não apresentou diferença quando comparado aos animais controles sedentários ou treinados.

Tabela 12 - Conteúdo de leptina sérica (ng/ml) e no tecido adiposo epididimal (ng/mg) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros	CS	CT	DS	DT
Leptina sérica	19,9±4	11±5,8 ^a	3,5±2,3 ^{a,b}	3,7±3,1 ^{a,b}
Leptina tecidual	0,15±0,36	0,14±0,23	0,1±0,47 ^{a,b}	0,11±0,34

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05).

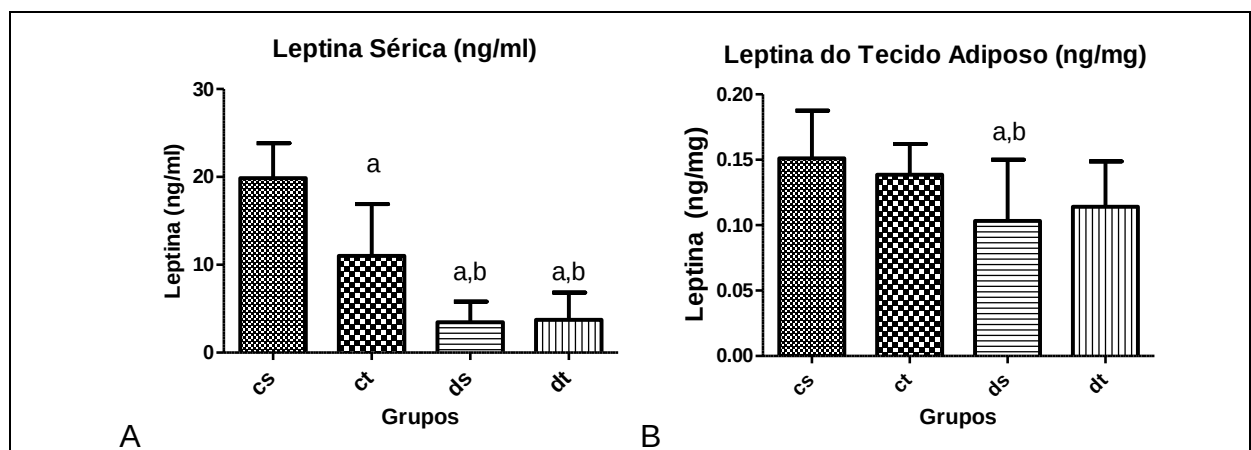


Figura 13. Conteúdo de leptina no sangue (A) e no tecido adiposo epididimal (B) dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. a ≠ de CS; b ≠ de CT; (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05).

Para estudar o tecido adiposo epididimal, foram analisados os conteúdos de proteína, DNA e a razão proteína/DNA. Neste tecido, o grupo DS teve maiores teores de DNA comparado ao CS. Com relação à razão proteína/DNA, os controles sedentários tiveram valores maiores que os demais grupos estudados (tabela 13 e figura 14).

Tabela 13 - Conteúdo de proteína (mg/100mg), DNA (mg/100mg) e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental.

Parâmetros	Grupos	CS	CT	DS	DT
Proteína do tecido adiposo		5±1	4,6±1	7,4±4,8	4,5±1,1
DNA do tecido adiposo		0,03±0,01	0,04±0,01	0,08±0,5 ^a	0,05±0,02
Razão proteína/DNA do tecido adiposo		196,2±70,2	116,5±41,9 ^a	98,4±21,4 ^a	88±12,3 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS (Para : ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; para proteína; teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

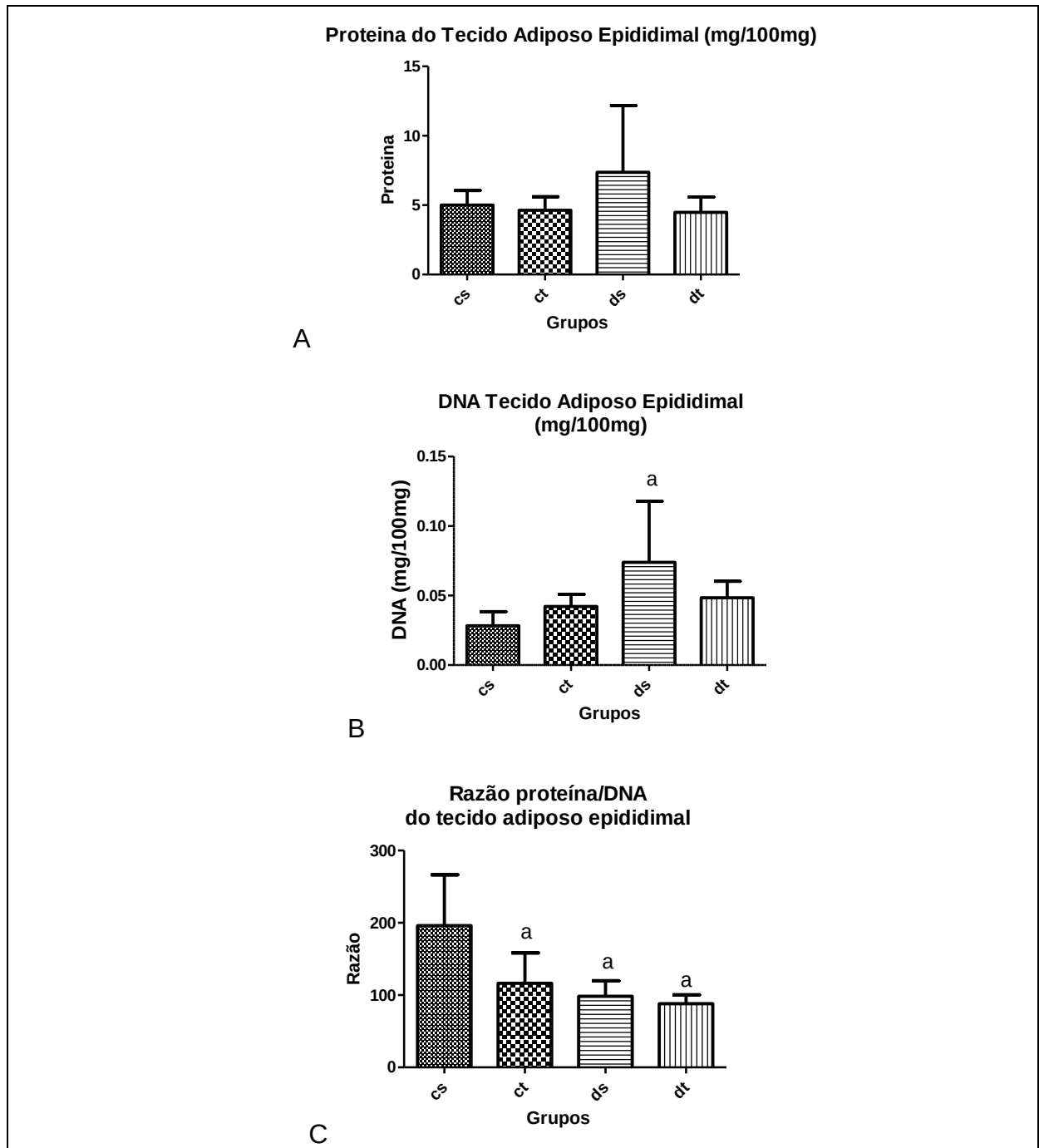


Figura 14. Conteúdo de proteína (A), DNA (B) e razão proteína/DNA (C) do tecido adiposo epididimal dos animais pertencentes aos grupos controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT) ao final do período experimental. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. ^a $\neq$ de CS (Para DNA e razão: ANOVA, *post-hoc* Bonferroni $p < 0,05$; para proteína: teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis).

6 DISCUSSÃO

Os efeitos do treinamento físico em animais diabéticos são de profundo interesse para a comunidade científica, sendo intensivamente pesquisados. Apesar de todo o esforço dedicado, há muito ainda que percorrer na busca de esclarecimentos, através da ciência básica, dos fenômenos e seus mecanismos de ação envolvidos para que *a posteriori* possam, comprovados e direcionados pela ciência aplicada, contribuir para prevenção e tratamento desta doença.

Para isso, a utilização de modelos experimentais que mimetizem com precisão os sintomas e complicações do diabetes é de fundamental importância. O modelo de diabetes experimental induzido por drogas como aloxana ou estreptozotocina cuja administração destrói seletivamente as células β pancreáticas, apresenta uma série de características comuns ao diabetes mellitus. Desde sua descoberta como agente diabetogênico apresentada por Dunn e colaboradores em 1943, a aloxana é reconhecida indutora do estado diabetogênico. Isto é alcançado após a completa desgranulação e perda de integridade das células beta (LENZEN, 2008). Em estudo prévio, apresentamos que brevemente após ser injetada a aloxana causa determinadas características do diabetes mellitus nos animais, como polidipsia (24 horas) e hiperglicemia (192 horas) enquanto outras características são desenvolvidas posteriormente (LEME et al., 2010).

No presente trabalho, uma série de características do diabetes experimental pôde ser observada como redução da massa corporal, do comprimento e da diferença entre as massas final e inicial; presença de polifagia e polidipsia, demonstradas pelos aumentos das ingestões alimentar e hídrica; bem como hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipoinsulinemia. Esta instauração do quadro diabético foi também demonstrada em estudos prévios utilizando doses semelhantes da droga e é de fundamental importância para demonstrar a eficácia da indução do diabetes (LERCO et al., 2003; LENZEN, 2008; LEME et al., 2010).

A insulinopenia, demonstrada no presente estudo, é o marco inicial da diabetogenicidade da aloxana nos animais e é esperada pela lesão seletiva das células beta, devido ao ciclo redox e geração de espécies reativas de oxigênio. A

ação da droga se inicia logo após sua infusão, quando os animais apresentam hipoglicemia leve, devido a inibição da glicoquinase, com posterior aumento da concentração de glicose no sangue causado por inibição da secreção de insulina. Nesta fase, que dura entre 2 a 4 horas, as células beta apresentam importantes alterações morfológicas como dilatação do retículo endoplasmático, diminuição da área de Golgi e redução dos grânulos secretórios e do conteúdo de insulina. A fase posterior é caracterizada por severa hipoglicemia originada pelo vazamento da insulina para a corrente sanguínea como resultado da ruptura dos grânulos secretórios e da membrana celular. A completa perda da integridade das células beta ocorre entre 12 e 48 horas após a injeção, sendo instaurado o quadro de ausência da insulina sanguínea (LENZEN, 2008).

Como consequência à insulinopenia, os animais diabéticos aloxânicos do presente estudo tiveram concentrações elevadas de glicose e triglicerídeos no sangue. A insulina exerce importantes funções no organismo como redução da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas e aumento da entrada de glicose nas células de forma dependente do transportador de glicose GLUT-4. A ausência da insulina, portanto, desregula esse controle glicêmico, gerando hiperglicemia. Concomitantemente ao aumento da glicemia, mas de forma mais lenta, o progresso da doença causa elevação da concentração de triglicerídeos no sangue junto à redução de tecido adiposo. Na primeira semana da indução do diabetes aloxânico parece não haver aumento significativo da trigliceridemia (LEME et al., 2010). Contudo, uma elevação progressiva pode ocorrer (ALTURA et al., 1981), associada a redução da atividade catalítica da enzima lipase lipoprotéica (LPL) no tecido adiposo (SIMSOLO et al., 1992). O tratamento com insulina reduz a hipertrigliceridemia e aumenta nos adipócitos a atividade e expressão de RNAm da LPL, diminuído principalmente no tecido adiposo de animais diabéticos (TAVANGER et al., 1992; ONG et al., 1998).

Uma das consequências do desequilíbrio glicêmico em organismos diabéticos é o aumento da ingestão hídrica, oriundo da poliúria e da polidipsia. A hiperglicemia resulta em aumento da osmolaridade sanguínea, glicosúria e perda excessiva de água e eletrólitos, particularmente o sódio, numa busca da manutenção do equilíbrio osmótico. Como consequência à desidratação, a sede funciona como mecanismo compensatório por ativação dos osmoreceptores cerebrais, aumentando a ingestão

hídrica (ALBERTINI et al., 1998; LERCO et al., 2003). Por outro lado, a ausência de alterações na albuminemia, pode demonstrar a ausência da desidratação, visto que, em estado de privação de ingestão hídrica ocorre aumento da albuminemia (PETERS et al., 1982; TAWAR et al., 1989).

Tendo comprovado a instauração de diversas características do diabetes nos animais que receberam a injeção de aloxana, é possível estudar com segurança os efeitos do treinamento físico nestes animais. Para isso, foi escolhido o treinamento físico realizado abaixo (90%) da transição metabólica aeróbia/anaeróbia. Em nosso estudo, os valores das cargas em porcentagem do peso corporal foram determinadas de forma individual, após realização do teste de máxima fase estável do lactato (GOBATTO et al., 2001). Os valores das cargas dos animais diabéticos foram menores, corroborando com estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2007) utilizando o teste de lactato mínimo.

O valor de glicemia do grupo diabético treinado continuou maior que os animais controles (CS e CT), porém foi menor que o valor do grupo diabético sedentário demonstrando o efeito do treinamento físico em amenizar a hiperglicemia diabética. Também foi encontrada redução das concentrações séricas de triglicerídeos nos animais diabéticos treinados, apesar da não alteração da insulinemia. Estes efeitos benéficos do treinamento físico também foram encontrados em outros estudos realizados em animais diabéticos utilizando treinamento em esteira ou natação (COSKUN et al., 2004; GOMES et al., 2006; LEME et al., 2009). Em um estudo interessante, Coskun e colegas (2004) demonstraram que o treinamento físico aeróbio realizado em três diferentes intensidades foi eficaz em reduzir a glicemia dos animais diabéticos treinados, além de prevenir parcialmente o desenvolvimento do diabetes quando realizado antes da injeção da aloxana. Todavia, existem autores que não encontraram alterações na glicemia de animais diabéticos submetidos ao treinamento físico, sendo necessárias investigações mais profundas com relação ao tipo, intensidade e duração do treinamento, bem como forma de indução ou intensidade da doença (GOODYEAR et al., 1988; HOAWERT et al., 2009).

Dentre os mecanismos que podem estar envolvidos nestas respostas benéficas da glicemia ao treinamento físico estão a melhoria da resposta à insulina, envolvendo mecanismos relacionados à sua sinalização após a ligação ao receptor

como aumento na fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e -2) e da PI3-kinase e do número de GLUT-4, mas ainda na atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase (LUCIANO et al., 2002; NAKAI et al., 2002). Com relação ao TG, a redução pelo treinamento físico parece estar relacionada à diminuição da secreção de TG hepático e aumento da remoção pela musculatura esquelética por aumento da atividade da lipase lipoprotéica, além de recuperação da massa adiposa em animais diabéticos (MONDON et al., 1984, HAMILTON et al., 2001).

A insulinopenia aumentou também as concentrações de TG no fígado. Isso ocorre possivelmente pelo aumento da reesterificação hepática, bem como pela redução da atividade da lipase lipoprotéica (MEIER et al., 1972). Interessante que a insulina tem seu efeito no acúmulo de TG no fígado influenciado pelo estado do organismo. Isso foi demonstrado em estudo realizado por Zammit e colaboradores (1999) que demonstraram haver efeitos opostos da insulina no organismo diabético alimentado e não diabético em jejum comparados a não diabético em estado alimentado, sendo estimulador da secreção de TG hepático nos primeiros e inibidor no segundo. A ausência de leptina também pode estar envolvida na associação entre diabetes e aumento do TG hepático (SHIMABUKURO et al., 1997). O treinamento físico reduziu parcialmente os valores de TG hepático nos animais diabéticos, pois apesar de não ter apresentado diferença significativa comparado ao DS, o DT também não diferiu dos grupos controles. Uma possível explicação para redução deste parâmetro está na diminuição do fluxo de ácidos graxos livres no fígado (BARAKAT et al., 1987). Nos demais parâmetros estudados no fígado, o diabetes causou redução da razão proteína/DNA nos animais diabéticos, podendo ter reduzido o tamanho das células neste órgão.

A comprovação da instauração do quadro diabético e de alterações desencadeadas pelo treinamento físico aeróbio nos animais diabéticos permite estudar o comportamento de outros parâmetros pouco ou nada apresentados pela literatura. No presente estudo, investigamos as influências do diabetes e treinamento físico nos hormônios GH, IGF-I, grelina e leptina.

O eixo GH-IGF está altamente relacionado ao crescimento corporal, particularmente do tecido ósseo. Dentre os dados estudados antes da eutanásia dos animais, o diabetes reduziu a massa e o comprimento dos animais, mas o treinamento físico não foi eficaz em recuperar. É possível que alterações no eixo

GH-IGF estejam envolvidas neste prejuízo, acentuando os efeitos diretos da insulinopenia. O GH sérico também foi reduzido pelo diabetes e não sofreu alterações pelo treinamento físico. Estes resultados corroboram com estudos prévios, considerando que a redução do GH em animais diabéticos induzidos por aloxana ou STZ foi documentada por uma série de estudos (KIM et al., 2006, BLUET-PAJOT et al., 1983; OLCHOVSKY et al., 1990), enquanto outros estudos demonstraram que treinamento físico aeróbio não altera esta redução nos animais diabéticos (LUCIANO; MELLO, 1998; GOMES et al., 2003, 2006).

Para investigar possíveis mecanismos relacionados a esta redução no GH circulante foram verificadas as concentrações teciduais de GH na hipófise, o sítio sintetizador e secretor deste hormônio. Nossos resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram haver redução no conteúdo peptídico de GH na hipófise de animais diabéticos (BLUET-PAJOT et al., 1983; OLCHOVSKY et al., 1990). A redução no aporte de GHRH em contraste à ausência de alterações nas características cinéticas da somatostatina são possíveis responsáveis sinérgicos pela diminuição na concentração de GH hipofisário (BLUET-PAJOT et al., 1983; OLCHOVSKY et al., 1990). Além disso, elevados valores de IGF-I hipofisário foram encontrados em animais diabéticos, podendo contribuir nessa supressão da produção de GH (OLCHOVSKY et al., 1991). Interessante que no presente estudo as concentrações de GH na hipófise de animais diabéticos não foram alteradas pelo treinamento físico aeróbio, mantendo-se reduzidas quando comparadas aos controles. É possível que o mecanismo que induz a redução deste parâmetro em animais diabéticos não seja alterado pelo treinamento físico, sendo um campo de pesquisa para futuros estudos.

Assim como ao GH, o diabetes experimental reduziu as concentrações de IGF-I sérico e hepático, corroborando com estudos previamente realizados utilizando animais diabéticos induzidos por aloxana (GOMES et al., 2006; LEME et al., 2007), STZ (HAN e PAR, 2006) e pancreatectomia parcial (FARREL et al., 1999). A diminuição das concentrações sanguíneas de insulina (KRAYTOR et al., 2001), de GH (GOMES et al., 2006), diminuição dos receptores de GH nas células alvo (LANDAU et al., 2000) e anormalidade na presença de IGFBPs (KOBAYASHI et al., 1999) podem contribuir de forma sinérgica para reduzir as concentrações séricas e hepáticas de IGF-I no modelo experimental de diabetes.

Por outro lado, os efeitos do treinamento físico nas concentrações de GH e IGF-I em animais diabéticos do presente estudo foram distintos. Os animais diabéticos treinados tiveram concentrações de GH sérico e hipofisário menores que os controles (CS e CT), mas as concentrações de IGF-I sérico e hepático destes animais não apresentaram reduções quando comparados aos animais controles sedentários ou treinados. Essa resposta do IGF-I foi apresentada em diversos estudos anteriores que envolveram mesmo modelo de indução de diabetes e protocolo de treinamento físico semelhante (GOMES et al., 2006; LEME et al., 2009; GOMES et al., 2009).

A relação entre exercício físico e IGF-I é complexa e envolve uma série de fatores como tipo, intensidade e duração do exercício, período e número de sessões do treinamento ou idade, estado nutricional e condicionamento físico dos sujeitos (FRIENERICH, 2004). No presente estudo, o treinamento físico de natação foi realizado durante 8 semanas e em intensidade equivalente a 90% da máxima fase estável do lactato (MFEL). Em estudos prévios realizados em nosso laboratório com intensidade e duração próximas aos realizados no presente estudo e sendo o diabetes induzido por aloxana em condições semelhantes, também foram encontradas recuperações nos valores de IGF-I no sangue, músculo e fígado de animais diabéticos treinados (GOMES et al., 2006, LEME et al., 2009). Em relevante estudo, Zanconatto e colaboradores (1994) demonstraram que o treinamento físico aumentou significativamente (~30%) o RNAm do IGF-I no fígado de animais com supressão de GH, demonstrando ser o treinamento um estímulo parcialmente independente do GH para aumentar a produção de IGF-I. Além disso, a recuperação do IGF-I de forma independente do GH pode estar relacionada às alterações na resistência hepática ao GH encontrada nos animais diabéticos (JOHANSEN et al., 2003). Futuros estudos podem analisar a resposta dos animais diabéticos treinados ao GH e o mecanismo de ação deste hormônio.

Além de estudar as concentrações de IGF-I sérico e hepático, esta tese apresenta resultados do conteúdo de IGF-I no pâncreas. Os valores de IGF-I neste órgão foram aumentados nos animais diabéticos submetidos ao treinamento físico comparados aos demais grupos. O grupo diabético sedentário não apresentou diferença comparado ao controle sedentário, corroborando com estudo prévio realizado por Hansson e colaboradores (1988). O aumento encontrado em animais

diabéticos submetidos ao treinamento físico não foi apresentado em nenhum estudo prévio na literatura. Acreditamos que o treinamento físico associado ao diabetes tenha potencializado alguma resposta pancreática em relação ao referido fator de crescimento.

Também estudamos possíveis alterações nas células pancreáticas, através das técnicas de quantificação do conteúdo de proteína, DNA e razão entre eles. Estas análises contribuem para investigar a natureza do crescimento, sendo observados dois tipos de crescimento: a hiperplasia e a hipertrofia. O número de células ou núcleos pode ser estimado pelo teor de DNA tecidual, tornando-se um indicador de hiperplasia. O tamanho ou área celular pode ser estimado pela razão proteína/DNA como indicador de hipertrofia tecidual (BARROSSO et al., 1998). Nestes parâmetros, ocorreu aumento da razão proteína/DNA, o que pode indicar hipertrofia nas células pancreáticas dos animais diabéticos treinados. A ausência de alterações no conteúdo de DNA pancreático indica que pode não ter havido hiperplasia nessas células. Em estudo realizado com ratos *Lewis*, Montanya e colaboradores (2000) demonstraram que as células beta têm forma de crescimento dependente da idade, ocorrendo aumento do número e tamanho das células nos meses iniciais de vida, e hipertrofia nos meses posteriores. Estudos envolvendo exercício e massa de células beta são muito raros. Ao estudar os efeitos do treinamento em animais pancreatectomizados (90% de pancreatectomia), Choi e colaboradores (2005) concluíram que o treinamento estimulou o aumento da massa de células beta pancreáticas como resultado de hiperplasia pela ativação da cascata de sinalização IGF-I/insulina via IRS-2.

É relevante, todavia, ressaltar a ausência de alterações na insulinemia, não havendo recuperação deste parâmetro nos animais diabéticos treinados. Além disso, em nosso estudo, não foi diferenciado o tipo celular, sendo demonstrados apenas os fenômenos de aumento das concentrações de IGF-I e possível hipertrofia das células pancreáticas que pode ser resultante dos níveis de IGF-I aumentados neste órgão.

Se os efeitos do diabetes e exercício físico em determinados parâmetros pertencentes ao eixo GH-IGF têm sido apresentado por uma série de estudos, por outro lado os efeitos destes na grelina são muito escassos. Isto porque este

importante secretagogo do GH foi descoberto recentemente (KOJIMA et al., 1999). É importante ressaltar que a grelina é gerada de um precursor, a pré-progrelina, que após clivagem perde o sinal peptídico, tornando-se o peptídeo pró-grelina (ROMERO et al., 2010). A pró-grelina é novamente clivada para originar a grelina que, antes de ser secretada, pode sofrer a ação da enzima GOAT (*ghrelin Oacyltransferase*) que promove a de um ácido graxo a serina, o terceiro aminoácidos dos 28 que constituem a grelina, por ligação a um ácido n-octanóico e, em menor extensão, a um decanoil (KOJIMA et al., 1999; KOJIMA; KANGAWA, 2005; YANG et al., 2008). A grelina é classificada como acilada quando a molécula sofre acilação ou não-acilada quando é secretada sem a acilação. No presente estudo, nós investigamos as concentrações de grelina acilada no plasma e estômago dos animais, pois está relacionado às funções de estimuladora da fome e secretagogo do GH.

O aumento das concentrações plasmáticas de grelina nos animais diabéticos corrobora com estudos prévios (ISHII et al., 2002; MASAOKA et al., 2003, TSUBONE et al., 2005). Este efeito ocorre a despeito das reduções das concentrações de GH e IGF-I, apesar de sua importante função como secretagogo do GH. Por outro lado, a redução no GH sanguíneo pode contribuir para o aumento da grelinemia (ISHII et al., 2002). Possíveis alterações no mecanismo de ação da grelina na hipófise podem contribuir para estas alterações.

Todavia, além de agir como secretagogo do GH, a grelina acilada foi apresentada como peça chave na estimulação da fome (WREN et al., 2000). Após essa descoberta, os pesquisadores buscaram encontrar uma relação entre a grelina e a hiperfagia diabética. Em 2002, Ishii e colegas apresentaram um importante estudo onde verificaram de forma pioneira as relações entre grelina e hiperfagia em animais diabéticos induzidos por STZ. Neste estudo, os autores demonstraram que quatorze dias após a indução, os animais apresentaram aumento da ingestão alimentar e concomitante aumento da grelina sérica. Além disso, o diabetes reduziu a leptinemia e aumentou a expressão de RNAm do peptídeo orexigênico neuropeptídeo Y (NPY) nos neurônios do núcleo arqueado. Nesse trabalho, porém, Ishii e seus co-autores apresentaram valores de grelina total no sangue (acilada e não-acilada). Masaoka e seus colegas (2003) avaliaram as concentrações de grelina

acilada de forma isolada, e apresentaram semelhante aumento da grelina acilada nos animais diabéticos.

Ao estudar a concentração de grelina acilada em seu principal sítio produtor, a região fúndica do estômago, encontramos aumento das concentrações nos animais diabéticos de forma similar às concentrações séricas e à ingestão alimentar. Neste parâmetro, porém, o presente estudo não corrobora com os resultados de Masaoka e colegas (2003), que apresentaram redução deste parâmetro nos animais diabéticos. Dentre os fatores que podem contribuir para esclarecer esta diferença está o fato da eutanásia ter sido realizada com os animais em jejum no estudo de Masaoka enquanto, em nosso trabalho, optamos por estudar os animais em estado alimentado. Sendo assim, o conteúdo gástrico dos animais diabéticos sedentários foi maior que nos demais grupos, podendo esta variação ter contribuído para inibir a secreção de grelina, aumentando sua concentração (armazenamento) nas células produtoras. O aumento da massa do estômago vazio do presente estudo também pode ter contribuído para esta alteração, considerando que no estudo de Masaoka o diabetes não alterou o peso do estômago. É importante citar, contudo, que nos estudos de Tsubone e colaboradores, (2005) foram encontrados valores aumentados de RNAm de grelina no estômago de animais diabéticos comparados aos controles.

Buscando estudar o principal órgão secretor de grelina, além do registro da massa do estômago, foram feitas as análises de proteína e DNA deste órgão. A redução no DNA pode indicar ausência de hiperplasia no aumento da massa do estômago dos animais diabéticos (DS e DT). Concomitante ao aumento da grelina acilada no sangue e estômago e da massa do estômago, ocorreu aumento da ingestão alimentar pelo diabetes. A hiperfagia diabética ocorre posteriormente ao aumento da grelina circulante, tendo o peptídeo uma função causal no desenvolvimento desta desordem (GELLING et al., 2004). Aliás, Dong e colaboradores (2006) demonstraram que o aumento na grelinemia é primário na indução da hiperfagia diabética, havendo apenas posteriormente o aumento da expressão de NPY e redução da expressão de α -MSH.

Se os estudos que investigaram grelina e diabetes têm esclarecido essa relação, estudos que avaliaram a relação entre treinamento físico e grelina em ratos

são muito raros. Dentre estes poucos artigos, Ebal e colaboradores (2007) demonstraram redução na ingestão alimentar e na grelinemia em animais submetidos ao treinamento de força. O grupo de Ghanbari-Niaki realizou dois estudos. Em um estudo publicado em 2009, Ghanbari-Niaki e seus co-autores demonstraram haver redução na grelinemia em animais treinados em esteira durante 6 semanas. Porém, em um recente estudo (2010), Fathi, Ghanbari-Niaki e Kraemer demonstraram haver aumento nos valores de grelina sérica de maneira intensidade-dependente e redução nos valores de grelina no estômago. Um fator determinante para a diferença entre os dois resultados é a eutanásia ter sido feita no estado alimentado no primeiro e de jejum no segundo artigo.

Em nosso estudo, o treinamento físico não alterou o conteúdo plasmático ou tecidual de grelina acilada nos animais controles. Por outro lado demonstramos, até onde sabemos de forma pioneira, que o treinamento físico reduziu as concentrações de grelina acilada na região fúndica do estômago dos animais diabéticos, apresentando valores iguais aos controles. Interessante que o treinamento físico aeróbico também reduziu a ingestão alimentar e a massa do estômago nos animais diabéticos, podendo haver contribuição da redução da concentração da grelina fúndica em amenizar a hiperfagia em animais diabéticos treinados.

Também ao estudar o efeito do treinamento físico, é necessário levar em conta que nosso estudo foi realizado com os animais em estado alimentado, controlando o conteúdo gástrico através de registro do peso deste após a eutanásia. Neste parâmetro, o conteúdo gástrico no DT foi menor que no DS podendo ter contribuído para aumentar as concentrações de grelina no sangue. Porém, se em animais controles a redução da grelinemia é quase imediata à ingestão alimentar, em animais diabéticos não treinados ela parece ser mais lenta, sendo mantido nível constante mesmo após a alimentação (ARIGA et al., 2008).

Para o controle da fome, porém, uma série de outros componentes é exigida, dentre os quais está a leptina. Em nosso estudo foi encontrada redução nas concentrações de leptina no sangue e no tecido adiposo epididimal dos animais diabéticos sedentários. Estes resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram haver redução de leptina no quadro de diabetes concomitantemente a hiperfagia (HAVEEL et al., 1998; HIKADA et al., 2001) ,

A redução da leptina parece ser causal na elevação da grelina plasmática, posto que sua administração a animais diabéticos reduz a grelinemia sem alterar a insulinemia (TSUBONE et al., 2005). Por outro lado, a administração de grelina parece reverter os efeitos da leptina na ingestão alimentar em ratos normais demonstrando possuir efeitos regulatórios uma à outra (KIM et al., 2004). Em um editorial com o sugestivo título: "*Ghrelin–Leptin Tango in Body-Weight Regulation*" Cummings e Foster (2003) apontam evidências que sugerem uma ação em paralelo da grelina e leptina com efeitos contrapostos uma à outra na regulação da massa corporal e controle da fome. Porém, ambas parecem sofrer a interferência da insulina para controlarem a ingestão alimentar (PATEL et al., 1998; TSUBONE et al., 2005).

A redução da leptinemia parece estar relacionada de forma primária à hiperfagia diabética (SINDELAR et al., 1999), visto que, apesar do efeito anorexigênico da insulina, a leptina é o modulador chave para recuperar a ingestão alimentar em STZ tratados com insulina (HIDAKA et al., 2001).

Desde os primeiros estudos que demonstraram a hiperfagia no diabetes experimental, as descobertas posteriores contribuíram para esclarecer este fenômeno demonstrando aumento nos neuropeptídeos hipotalâmicos orexigênicos como NPY e peptídeo agouti (AgRP) e redução de pró-opiomelanocortina (POMC) e hormônio liberador de corticotropina (CHR) (Fujikawa et al., 2010). Posteriormente, foi demonstrado que o balanço entre grelina, leptina e insulina é sinalização fundamental para o controle da fome e balanço energético no organismo (Cummings e Foster, 2003). No presente estudo as modificações desencadeadas pela insulinopenia alteraram as concentrações de leptina e grelina culminando na hiperfagia.

Com relação aos efeitos do treinamento físico na leptina, três resultados podem ser destacados: a redução da leptinemia nos animais controles treinados; a ausência de alterações na leptinemia de animais diabéticos treinados comparados aos diabéticos sedentários; e a recuperação da leptina tecidual nos animais diabéticos treinados.

A redução da leptina no grupo controle treinado ocorreu em conjunto a outros parâmetros encontrados: a ausência de alterações na ingestão alimentar, na grelina acilada e na insulinemia, bem como a redução na razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal. A manutenção da ingestão alimentar a despeito da redução da leptinemia pode estar relacionada a melhorias na resposta à leptina e à insulina. Flores e colaboradores (2006) demonstraram que o exercício agudo parece melhorar a sensibilidade hipotalâmica à leptina e à insulina. Em exercício crônico, Roppelle e colaboradores (2010) demonstraram que o exercício pode promover redução na fosforilação de I[κ] kinase beta (IKKb) e aumento da expressão de I[κ]B alpha (IkBa), bem como redução nos marcadores de estresse de retículo endoplasmático hipotalâmico através da estimulação da produção de interleucinas (IL) antiinflamatórias como IL-6 e IL-10. Esse conjunto de efeitos pode melhorar a sensibilidade do hipotálamo à leptina. Essa poderia ser uma hipótese que contribuiria para explicar a possível melhoria na ação da leptina causada pelo treinamento físico.

O aumento da razão proteína/DNA pode indicar hipertrofia, demonstrando que a possível redução do adipócito pode estar relacionada à redução da leptinemia. Este fato concorda com estudo de Myazaki e colegas (2010) no qual foi apresentado que a diminuição na leptinemia pelo treinamento físico é intermediada pela ação deste em reduzir o tamanho do adipócito. Interessante também que, apesar do treinamento físico depender da redução do adipócito para diminuir a leptinemia, no presente estudo isto aconteceu de forma independente de alterações na ingestão alimentar, grelinemia e insulinemia.

Nos animais diabéticos, o treinamento físico não alterou as baixas concentrações de leptina no sangue, mas recuperou a concentração deste peptídeo no tecido adiposo epididimal. Desta forma, pode ter ocorrido manutenção da leptina no tecido adiposo pela redução de sua secreção, o que pode estar relacionado a melhoras na função do tecido adiposo como aumento do GLUT-1 e GLUT-4 (FERRARA et al., 1998). Em nosso estudo ainda houve redução da trigliceridemia, podendo estar relacionada à melhoria na função do tecido adiposo. Além das alterações morfológicas no sítio produtor, pode ocorrer também melhoria na

sinalização hipotalâmica da leptina e da insulina causada pelo treinamento físico, aumentando a eficácia de sua ação (ROPPELE et al., 2010).

Se para a grelina o treinamento físico alterou suas concentrações teciduais, a leptina tecidual teve aumento sutil (cerca de 10%) nos animais diabéticos treinados e aproximou este valor dos controles, não apresentando diferença por um lado quando comparado aos controles, mas também aos animais diabéticos sedentários. Este efeito pode caracterizar preservação da leptina no sítio produtor, pois mesmo sem alterações séricas, o treinamento físico causou redução na ingestão alimentar.

As concentrações de insulina, leptina e grelina afetam diretamente o controle da fome e da saciedade, bem como, o armazenamento da energia obtida na ingestão alimentar. Desta forma, influenciam diretamente na manutenção da homeostase da energia no organismo. A contribuição do treinamento físico em reduzir a hiperfagia diabética mesmo sem alterar os valores de insulina, sendo possivelmente intermediado pela redução da concentração de grelina no estômago e recuperação da leptina no tecido adiposo pode auxiliar o organismo diabético na manutenção da homeostase da energia. Estudos futuros poderão ser realizados utilizando outras técnicas que permitam analisar os mecanismos de ação hipotalâmico destes hormônios e, assim, contribuir para avanços no entendimento das relações entre as alterações causadas pelo treinamento físico nestes hormônios e, conseqüentemente no controle da fome e homeostase da energia em animais diabéticos.

7 CONCLUSÕES

O treinamento físico realizado numa intensidade equivalente a 90% da MFEL amenizou determinados prejuízos causados pelo diabetes experimental nas condições estudadas. Nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, o treinamento físico aeróbio reduziu a glicemia e trigliceridemia em animais diabéticos a despeito da ausência de alterações na insulinemia. Apesar da redução, não retornaram aos valores dos animais controles.

Com relação ao eixo GH-IGF, o treinamento físico aeróbio recuperou os valores de IGF-I no sangue e no fígado de forma independente de alterações nas concentrações de GH no sangue e hipófise. Todavia, o treinamento físico também não alterou o comprimento ou massa corporal dos animais diabéticos.

Nestas condições experimentais, o treinamento físico aumentou a concentração de IGF-I no pâncreas dos animais diabéticos, sendo ainda encontrado aumento da razão proteína/DNA no pâncreas destes animais, podendo indicar hipertrofia nas células deste tecido.

O treinamento físico amenizou a hiperfagia diabética ao longo do período experimental, mesmo sem alterar a insulinemia, causando ainda redução na massa do estômago. A redução nas concentrações de grelina acilada no estômago a recuperação da leptina no tecido adiposo epididimal e a redução na massa do estômago podem ter contribuído para diminuição da ingestão alimentar. A ausência de alterações destes hormônios no sangue, porém, pode estar relacionada à redução no conteúdo gástrico dos animais diabéticos treinados com relação à grelina e possíveis melhorias na ação da leptina.

Desta forma, o treinamento físico realizado em intensidade equivalente a 90% da MFEL promove adaptações metabólicas e hormonais que podem contribuir na preservação do organismo diabético.

8 REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Complete Guide to Diabetes**. Virginia, 4ed, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 29, p. S43-S48, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 33, s. 1, p. S62–S69, 2010.

ALTURA, B. M.; LUM, G.; TURLAPATY, P. D.; ALTURA, B. T. Sequential changes in serum glucose, triglycerides and cholesterol in aging of normal and alloxan-diabetic rats. **Experientia**, Basel, v. 15; n. 37, p. 224-226, 1981.

ARIGA, H. et al. Does ghrelin explain accelerated gastric emptying in the early stages of diabetes mellitus? **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 294, p. 1807-1812, 2008.

ASAKAWA, A. et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach structural resemblance to motilin. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 120, p. 337-345, 2001.

ATTOUB, S. et al. Physiological role of cholecystokinin B/gastrin receptor in leptin secretion. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 10, p. 4406-4410, 1999.

AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação**. 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) - Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARAKAT, H.A.; CARPENTER, J.W.; LENNON, Y.A.; HANNA, W.R., O'BRIEN, K.F.; DOHM, G.L. The effects of exercise on lipogenic enzyme activity and glyceride synthesis by liver homogenates of diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental**, New York, v. 36, n. 10, p. 983-7, 1987.

BARAZZONI, R. et al. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 288, p. E228–E235, 2005.

BARROSO, J.B. et al. Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 274, n.6, p. 1578-1587, 1998.

BELMONTE, M. et al. Rat myocellular and perimysial intramuscular triacylglycerol: a histological approach. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 36, n. 1, p. 60-67, 2004.

BLUET-PAJOT, M. T.; DURAND, D.; KORDON, C. Influence of streptozotocin-induced diabetes on growth hormone secretion in the rat. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 36, p. 307–309, 1983.

BÖNI-SCHNETZLER, M.; HAURI, C.; ZAPF, J. Leptin is suppressed during infusion of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF I) in normal rats. **Diabetologia**, Berlin, v. 42, n. 2, p. 160-6, 1999.

BOWERS, C. Y. et al. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. **Endocrinology**, Springfield, v. 114, n. 5, p. 1537–1545, 1984.

BROOM, D. R. et al. Exercise induced suppression of acylated ghrelin in humans. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 102, n. 6, p. 2165-2171, 2007.

BUTLER, A. A.; LEROITH, D. Control of Growth by the somatotropic Axis: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 63, p. 141-164, 2001.

CARRO, E. et al. Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 69, p. 3–10, 1999.

CELI, F. et al. Circulating acylated and total ghrelin and galanin in children with insulin-treated type 1 diabetes: relationship to insulin therapy, metabolic control and pubertal development. **Clinical Endocrinology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 139-145, 2005.

COSGROVE, M. Do stressful life events cause type 1 diabetes? **Journal of occupational medicine and toxicology**, London, v. 54 n. 4 p. 250-254, 2004.

CUMMINGS, D. E.; FOSTER, K. E. Ghrelin-leptin tango in body-weight regulation. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 124, n. 5, p. 1532-1535, 2003.

CUMMINGS, D. E. et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes**, New York, v. 50, p. 1714–1719, 2001.

CUMMINGS, D. E. et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, p. 1623–1630, 2002.

CUMMINGS, D. E. et al. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food related cues. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 287, p. E297–E304, 2004.

D'ERCOLE, A.; UNDERWOOD, L. Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor-I concentrations in the human fetus during the first half of gestation, **Pediatric Research**, Basel, v. 20, p. 253-255, 1986.

DA MOTA, G. R.; ZANESCO, A. Leptin, ghrelin, and physical exercise. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p. 25-33, 2007.

DALL, R. et al. Plasma ghrelin levels during exercise in healthy subjects and in growth hormone-deficient patients. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 147, n. 1, p. 65-70, 2002.

DATE, Y. et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, Springfield, v. 141, p. 4255–4261, 2000.

DAVALLI, A. M. et al. Pituitary cotransplantation significantly improves the performance, insulin content, and vascularization of renal subcapsular islet grafts. **Diabetes**, New York, v. 48, n. 1, p. 59-65, 1999.

DAVENPORT, A. P. et al. International union of pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 57, p. 541–546, 2005.

DIRLEWANGER, M. et al. Effect of moderate physical activity on plasma leptin concentration in humans. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, Berlin, v. 79, n. 4, p.331-335, 1999.

DISPENSARIES, D. Bicycle riding as a curative factor in diabetes. **JAMA : the Journal of the American Medical Association**. Chicago, v. XXXII, n.15, p. 830-831, 1899.

DIXIT, V.D. et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven v. 114, p. 57–66, 2004.

DUBOIS, B.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, n. 28, p. 350-356, 1956.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; MCLETCHE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, London, v. 1, p. 484-7, 1943.

EBAL, E.; CAVALIÉ, H.; MICHAUX, O.; LAC, G. Effect of a lipid-enriched diet on body composition and some regulatory hormones of food intake in growing rats. **Annales d'endocrinologie**, Paris, v. 68, n. 5, p. 366-71, 2007.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DAMASO, A.R.; RIBEIRO, E.B.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, Burbank, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004

FARREL P.A. et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.87, p.1075-82, 1999.

FATHI, R.; NIAKI, A.G.; KRAEMER, R.R. The effect of exercise intensity on plasma and tissue acyl ghrelin concentrations in fasted rats. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, 2010 Jun 11. No prelo.

FLANAGAN, D.E. et al. The influence of insulin on circulating ghrelin. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, Bethesda, v. 284, p.E313–E316, 2003.

FOSTER-SCHUBERT, K.E.; et al. Human plasma ghrelin levels increase during a one-year exercise program. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 90, n. 2, p. 820-5, 2005

FRYSTYK, J. Free insulin-like growth factors – mensuraments and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 14 p. 337-375, 2004.

FUJIKAWA, T.; CHUANG, J.C.; SAKATA, I.; RAMADORI, G.; COPPARI, R. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 40, p. 17391-17396, 2010.

GALE, E.A. Rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. **Diabetes**, New York, v. 51 p. 3353–3361, 2002.

GELLING, R.W., et al. Effect of uncontrolled diabetes on plasma ghrelin concentrations and ghrelin-induced feeding. **Endocrinology**, Springfield, v. 145, p. 4575-4582, 2004.

GEORGE, M.; AYUSO, E.; CASELLAS, A.; COSTA, C.; DEVEDJIAN, J.C.; BOSCH, F. Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 109, n. 9, p. 1153-1163, 2002.

GHANBARI-NIAKI, A. Ghrelin and glucoregulatory hormone responses to a single circuit resistance exercise in male college students. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 39, n. 10, p. 966-970, 2005.

GHANBARI-NIAKI, A. Ghrelin and glucoregulatory hormone responses to a single circuit resistance exercise in male college students. **Clinical biochemistry**, Toronto, v. 39, n.10, p. 966-970, 2006.

GHANBARI-NIAKI, A.; ABEDNAZARI, H.; TAYEBI, S.M.; HOSSAINI-KAKHAK, A.; KRAEMER, R.R. Treadmill training enhances rat agouti-related protein in plasma and

reduces ghrelin levels in plasma and soleus muscle. **Metabolism**, New York, v. 58, n. 12, p. 1747-1752, 2009

GILES, K.W.; MYERS, A. An improved diphenylamine method for estimation of DNA, **Nature**, London, v. 206, p. 93, 1965.

GNANAPAVAN, S. et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 87, p. 2988–2991, 2002.

GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; DE AZEVEDO, J.R.; DOS SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 130, n. 1, p. 21-7, 2001.

GOMES, R.J. et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 16, n. 5, p. 326-31, 2006.

GOMES, R.J. et al. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. **Hippocampus**, New York, v. 19, n. 10, p. 981-987, 2009

GOMES, R.J., CAETANO, F.H., HERMINI, H.A., ROGATTO, G.P., LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 11, p. 57-62, 2003.

GOODYEAR, L.J.; HIRSHMAN, M.F.; KNUTSON, S.M.; HORTON, E.D.; HORTON, E.S. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 844-51, 1988.

GRINSPOON, S. et al. Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Bethesda, v. 89, p. 3988–3993, 2004.

HAMILTON, M.T.; AREIQUAT, E.; HAMILTON, D.G.; BEY, L. Plasma triglyceride metabolism in humans and rats during physical inactivity. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**. Champaign, v. 11, p. S97-S104, 2001.

HAN, H.J.; PARK, S.H. Alteration of the gene and protein levels of insulin-like growth factors in streptozotocin-induced diabetic male rats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 5, p. 413-419, 2006.

HANSSON, H.A.; EDWALL, D.; LÖWENADLER, B.; NORSTEDT, G.; PALEUS, S.; SKOTTNER, A. Insulin-like growth factor I in the pancreas of normal and diabetic adult rats. **Acta physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 132, n. 4, p. 569-576, 1988.

HARVEY, J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 307–313, 2007.

HAVEL, P.J. et al.. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 274, n. 5, p. R1482-1491, 1998.

HECK, H., MADER, A., HESS, G., MÜCKE, S., MÜLLER, R., HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v. 6, n. 3, p. 117-130, 1985.

HENRY, R.J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical chemistry, principles and techniques**, 2nd ed. New York : Harper and Row, 1974.

HIDAKA, S. et al., Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 16, n. 6, p. 509-518, 2002.

HOLLOSZY, J.O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity, **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 99, p. 338-343, 2005.

HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P.; JI, S.; LEMENAGER, R.; SPURLOCK, M.E. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 164, n. 1, p. 51-57, 2000.

HOWARD, A.D. et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science**, Washington, v. 273, n. 5277, p. 974-977, 1996.

HOWARTH, F.C.; MARZOUQI, F.M.; AL SAEEDI, A.M.; HAMEED, R.S.; ADEGHATE, E. The effect of a heavy exercise program on the distribution of pancreatic hormones in the streptozotocin-induced diabetic rat. **Journal of the Pâncreas**, Genova, v. 10, n. 5, p. 485-491, 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. 4th edition. Brussels: International Diabetes Federation, 2009.

ISHII, S.; KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SHIMIZU, T.; SUGIHARA, H.; OIKAWA, S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. **Endocrinology**, Springfield, v. 143, n. 12, p. 4934-4937, 2002.

JACOB, R.J. et al. The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus. **Diabetes**, New York, v. 46, n. 1, p. 150-152, 1997.

JEN, K.L.; BUISSON, A.; PELLIZZON, M.; ORDIZ, F. JR.; SANTA ANA, L.; BROWN, J. Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 228, n. 7, p. 843-849, 2003.

JESSEN, N., GOODYEAR, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 99, p. 330-337, 2005.

JOHANSEN, P.B.; SEGEV, Y.; LANDAU, D.; PHILLIP, M.; FLYVBJERG, A. Growth hormone (GH) hypersecretion and GH receptor resistance in streptozotocin diabetic mice in response to a GH secretagogue. **Experimental Diabetes Research**, Philadelphia, v. 4, p. 73-81, 2003.

JURIMAE, J.; HOFMANN, P.; JURIMAE, T.; PALM, R.; MAESTU, J.; PURGE, P.; SUDI, K.; ROM, K.; VON DUVILLARD, S.P. Plasma ghrelin responses to acute sculling exercises in elite male rowers. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 99, n. 5, p. 467-474, 2007.

KAMEGAI, J. et al. Insulin-like growth factor-I down-regulates ghrelin receptor (growth hormone secretagogue receptor) expression in the rat pituitary. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 127, p. 203–206, 2005.

KAYTOR, E.N.; ZHU, J.L.; PAO, C.I.; PHILLIPS, L.S. Physiological concentrations of insulin promote binding of nuclear proteins to the insulin-like growth factor I gene. **Endocrinology**, Springfield, v. 142, p. 1041-1049, 2001.

KIM, M.S. et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin L1 adipocytes. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 18, p. 2291–2301, 2004.

KIM, E. et al. Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 188, p. 263–270, 2006.

KINEMAN, R.D. et al. Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. **Endocrinology**, Springfield, v.140, p.3581–3586, 1999.

KOBAYASHI, K et al. The involvement of growth hormone-binding protein in altered GH-IGF axis in IDDM. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 46, p. S67-69, 1999.

KOJIMA, M. et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, London, v. 402, p. 656–660, 1999.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin: structure and function. **Physiological Reviews**, Washington, v. 85, p. 495–522, 2005.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Drug insight: The functions of ghrelin and its potential as a multitherapeutic hormone. **Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism**, London, v. 2, p. 80–88, 2006.

KRAEMER, R.R.; CHU, H.; CASTRACANE, V.D. Leptin and exercise. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 227, n. 9, p. 701-708, 2002.

LAMMI, N.; KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J. Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? Medical Science Monitor. **International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, Warsaw, v. 11, n. 3, p. 63-69, 2005.

LANDAU, D.; SEGEV, Y.; ESHET, R.; FLYVBJERG, A.; PHILLIP, M. Changes in the growth hormone-IGF-I axis in non-obese diabetic mice. **International Journal of Experimental Diabetes Research**, Amsterdam, v. 1, p. 9-18, 2000.

LAPAGLIA.; STEINER, J.; KIRSTEINS, L.; EMANUELE, M.; EMANUELE, N. Leptin alters the response of the growth hormone releasing factor- growth hormone--insulin-like growth factor-I axis to fasting. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 159, n. 1, p. 79-83, 1998.

LARRSON, H.; ELMSTAHL, S.; AHRE'N, B. Plasma leptin levels correlate to islet function independently of body fat in postmenopausal women. **Diabetes**, New York, v. 45, p. 1580–1584, 1996.

LAWRENCE, C.B. et al. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. **Endocrinology**, Springfield, v. 143, p. 155–162, 2002.

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

LEIDY, H.J.; GARDNER, J.K.; FRYE, B.R.; SNOOK, M.L.; SCHUCHERT, M.K.; RICHARD, E.L.; WILLIAMS, N.I. Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normal-weight young women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 89, n. 6, p. 2659-2664, 2004.

LEME, J.A.C.A.; GOMES, R.J.; DE MELLO, M.A.; LUCIANO, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Factors**, Chur, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

LEME, J.A.C.A.; SILVEIRA, R.F.; GOMES, R.J.; MOURA, R.F.; SIBUYA, C.A.; MELLO, M.A.; LUCIANO, E. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Hormone & IGF Research**, London, v. 19, n. 3, 262-266, 2009.

LEME, J.A.C.A. et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos Wistar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, 2010.

LENZEN S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, p. 216-26, 2008.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, p. 132-142, 2003.

LEROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J. BUTLER, A. The somatomedins hypotheses: 2001. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 22, n. 1, p.53–74, 2001.

LI, J.B.; WANG, C.Y.; CHEN, J.W.; FENG, Z.Q.; MA, H.T. Expression of liver insulin-like growth factor 1 gene and its serum level in patients with diabetes. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 15, n. 10, p. 255-259, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.T. Protein measurement with the felinephenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, Y. et al. Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. **Diabetes**, New York, v. 53, p. 3131-41, 2004.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo / Metabolism of diabetic trained rats during fasting and acute exercise. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v. 18, p. 47-60, 1997.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v. 1, p. 39-46, 1998.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 147, p. 149-157, 2002

MALAGO'N, M.M. et al. Intracellular signalling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. **Endocrinology**, , Springfield, v. 144, p. 5372–5380, 2003.

MARZULLO, P.; BUCKWAY, C.; PRATT, K.L.; COLAO, A.; GUEVARA-AGUIRRE, J.; ROSENFELD, R.G. Leptin concentrations in GH deficiency: the effect of GH

insensitivity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 87, n. 2, p. 540-545, 2002.

MASAOKA, T. et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 24, p. 64-68, 2003.

MEIER, J.M.; MCGARRY, J.D.; FALOONA, G.R.; UNGER, R.H.; FOSTER, D.W. Studies of the development of diabetic ketosis in the rat. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 13, n. 2, p. 228-233, 1972.

MONDON, C.E.; DOLKAS, C.B.; TOBEY, T.; REAVEN, G.M. Causes of the triglyceride-lowering effect of exercise training in rats. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. 1466-71, 1984.

MONTANYA, E. et al., Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. **Diabetes**, New York, v. 49, p. 1341-1346, 2000

MORAES, C.; ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. Serum leptin level in hypertensive middle-aged obese women. **The Endocrinologist**, Baltimore, v. 15, p. 219-221, 2005.

MORPURGO, P.S.; RESNIK, M.; AGOSTI, F.; CAPPIELLO, V.; SARTORIO, A.; SPADA, A. Ghrelin secretion in severely obese subjects before and after a 3-week integrated body mass reduction program. **Journal of Endocrinological Investigation**, Baltimore, v. 26, n. 8, p. 723, 2003.

MUNDINGER, T.O. et al. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. **Endocrinology**, Springfield, v. 147, p. 2893–2901, 2006.

MURATA, M. et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. **Journal of Endocrinological Investigation**, Baltimore, v. 27, p. 5667–5674, 2002.

NAKAI, N. et al. Exercise training increases the activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle of diabetic rats. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 547-554, 2002.

NOGUEIRAS, R. et al. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. **Diabetes**, New York, v. 53, p. 2552–2558, 2004.

OGAWA, Y. et al. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. **Diabetes**, New York, v. 48, p. 1822–1829, 1999.

OLCHOVSKY, D. et al. Pituitary insulin-like growth factor-I content and gene expression in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for tissue-specific regulation. **Endocrinology**, Springfield, v. 128, p. 923-928, 1991.

OLIVEIRA, C.A.; LUCIANO, E.; MARCONDES, M.C.; DE MELLO, M.A. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, New York, v. 21, p. 258-264, 2007.

ONG, J.M.; KIRCHGESSNER, T.G.; SCHOTZ, M.C.; KERN, P.A. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, p. 12933-12938, 1988.

ORENSTEIN, M.R.; FRIEDENREICH, C.M. Review of Physical Activity and the IGF Family. **Journal of Physical Activity and Health**, Champaign, v. 1, n. 4, 2004.

ORTIZ-CARO, J. et al. Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food- restricted rats. **Endocrinology**, Springfield, v. 115, p. 2227-2232, 1984.

OVERDUIN, J. et al. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. **Endocrinology**, Springfield, v. 146, p. 845–850, 2005.

PAGOTTO, U. et al. Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 88, p. 4139–4143, 2003.

PASMAN, W.J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S.; SARIS, W.H. The effect of exercise training on leptin levels in obese males. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 274, p. E280-286, 1998.

PATTERSON, C.C.; DAHLQUIST, G.G.; GYÜRÜS, E.; GREEN, A.; SOLTÉSZ, G.; EURODIAB STUDY GROUP. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet**, London, v. 373, n. 9680, p. 2027-2033, 2009.

PAULI, J.R.; CINTRA, D.E.; SOUZA, C.T.; ROPELLE, E.R. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PÉRUSSE, L. et al. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 1, p. 5-10, 1997.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R.; Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

POMERANTS, T.; TILLMANN, V.; KARELSON, K.; JURIMAE, J.; JURIMAE, T. Ghrelin response to acute aerobic exercise in boys at different stages of puberty. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 38, n. 11, p. 752-757, 2006.

POTIER, P. et al. New aspects of diabetes. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 63, n. 6, p. 371-384, 2005.

POYKKO, S.M. et al. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. **Diabetes**, New York, v.52, p. 2546–2553, 2003.

QI, X. et al. Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 228, p. 1028–1032, 2003.

REAVEN, E.P.; PETERSON, D.T.; REAVEN, G.M. The effect of experimental diabetes mellitus and insulin replacement on hepatic ultrastructure and protein synthesis. **The Journal of Clinical Investigation**, Haven, v. 52, p. 248-262, 1973.

RESELAND, J.E.; ANDERSSSEN, S.A.; SOLVOLL, K.; HJERMANN, I.; URDAL, P.; HOLME, I.; DREVON, C.A. Effect of long-term changes in diet and exercise on

plasma leptin concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p.240-245, 2001.

ROBERTSON, K.; LU, Y.; DE JESUS, K.; LI, B.; SU, Q.; LUND, P.K.; LIU, J.L. A general and islet cell-enriched overexpression of IGF-I results in normal islet cell growth, hypoglycemia, and resistance to diabetes. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, Bethesda, v. 294, n. 5, p. 928-938, 2008

ROCHA-SOUSA, A. et al. Ghrelin as a novel locally produced relaxing peptide of the iris sphincter and dilator muscles. **Experimental Eye Research**, London, v. 83, p. 1179–1187, 2006.

ROMERO, A.; KIRCHNER, H.; HEPPNER, K.; PFLUGER, P.T.; TSCHÖP, M.H.; NOGUEIRAS, R. GOAT: the master switch for the ghrelin system? **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 163, n. 1, p. 1-8, 2010.

ROSEN, C.J.; POLLAK, M. Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. **Trends in endocrinology and metabolism**, New York, v. 10, n. 4, p. 136-141, 1999.

SCHMIDT, A. et al. Acute exercise has no effect on ghrelin plasma concentrations. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 36, n. 3, p. 174-177, 2004.

SHIYA, T. et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 87, p. 240–244, 2002.

SHIMABUKURO, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 4637–4641, 1997.

SIMSOLO, R.B.; ONG, J.M.; SAFFARI, B.; KERN, P.A.; Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 33, n. 1, p. 89-95, 1992.

SINDELAR, D.K.; HAVEL, P.J.; SEELEY, R.J.; WILKINSON, C.W.; WOODS, S.C.; SCHWARTZ, M.W. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, New York, v. 48, n. 6, p.1275-1280, 1999

SJOGREN, K. et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 8, n. 96, p. 7088-7092, 1999

SJÖGREN, K.; JASSON, J.O.; ISSAKSON, O.G.P.; OHLSSON, C. A transgenic model to determine the physiological role of liver derived insulin-like growth factor I. **Minerva Endocrinologica**, Torino, v. 27, p. 299-311, 2002.

SJOGREN, K. et al. Liver-derived IGF-I is of importance for normal carbohydrate and lipid metabolism. **Diabetes**, New York, v. 50, n.7, p. 1539-1545, 2001.

SPIEGELMAN, B.M.; FLIER, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, Cambridge, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

STEINBERG, G.R.; SMITH, A.C.; WORMALD, S.; MALENFANT, P.; COLLIER, C.; DYCK, D.J. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 286, n. 1, p. E57-63, 2004.

TANG-CHRISTENSEN, M. et al. Central administration of ghrelin and agoutirelated protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous Locomotor Activity in Rats. **Endocrinology**, Springfield, v. 145, n. 10, 2004.

TANNENBAUM, G.S.; GURD, W.; LAPOINTE, M. Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. **Endocrinology**, Springfield, v. 139, p. 3871–3875, 1998.

TAVANGAR, K. et al. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 90, p. 1672-1678, 1992.

TALWAR, G.P.; SRIVASTAVA, L.M.; MOUDGIL, K.D. **Textbook of biochemistry and human biology**. 2nd ed. New Delhi: Prentice-Hall of India, 1989.

TOLLE, V. et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. **Endocrinology**, Springfield, v. 143, p. 1353–1361, 2002.

TRITOS, N.A.; KOKKOTOU, E.G. The physiology and potential clinical applications of ghrelin, a novel peptide hormone. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 81, p. 653–660, 2006.

TSUBONE T, et al. Leptin downregulates ghrelin levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 289, p. 1703-1706, 2005.

VAN DER LELY, A.J.; TSCHÖP, M.; HEIMAN, M.L.; GHIGO, E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 25, n. 3, p. 426-457, 2004.

VESTERGAARD, E.T.; DALL, R.; LANGE, K H.W.; KJAER, M.; CHRISTIANSEN, J.S.; JORGENSEN, J.O.L. The Ghrelin Response to Exercise before and after Growth Hormone Administration. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 92, p. 297–303, 2007.

VUAGNAT, B.A.M. et al. Evidence for a leptin–npY axis for the regulation of growth hormone secretion in the rat. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 67, p. 291–300, 1998.

WARREN, P.M.; CONSTANTINI, W.N. **Sports Endocrinology**. New York, Humana Press, 2000.

WELTMAN, N.Y.; SALIBA, S.A.; BARRETT, E.J.; WELTMAN, A. The use of exercise in the management of type 1 and type 2 diabetes. **Clinics in Sports Medicine**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 423-439, 2009.

WILLESEN, M.G.; KRISTENSEN, P.; RØMER, J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 70, p. 306-316, 1999.

WREN, A.M. et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 86, p. 5992, 2001.

YASUDA, T. et al. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 349, p. 75–78, 2003.

YAMAZA, H. et al., Involvement of Insulin-Like Growth Factor-1 in the Effect of Caloric Restriction: Regulation of Plasma Adiponectin and Leptin. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, Washington, v.62, p.27-33, 2007.

YANG, J.; BROWN, M.S.; LIANG, G.; GRISHIN, N.V.; GOLDSTEIN, J.L. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. **Cell**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 387-396, 2008.

ZAMMIT, V.A.; LANKESTER, D.J.; BROWN, A.M.; PARK, B.S. Insulin stimulates triacylglycerol secretion by perfused livers from fed rats but inhibits it in livers from fasted or insulin-deficient rats implications for the relationship between hyperinsulinaemia and hypertriglyceridaemia. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 263, p.859-864, 1999.

ZANCONATO, S.; MOROMISATO, D.Y. et al. Effect of training and growth hormone suppression on Insulin-like growth factor I mRNA in young rats. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.76, n.5, p. 2204-2209, 1994.

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**, London, v. 372, p. 425–432, 1994.

ZIMMET, P.Z. Kelly West Lecture 1991: challenges in diabetes epidemiology: from west to the rest. **Diabetes Care**, New York, v. 15, p. 232-252, 1992.

9 APÊNDICE

Durante o período de desenvolvimento desta tese, uma série de artigos relacionados diretamente a tese ou de pesquisas paralelas foram publicados. Neste apêndice está a primeira página contendo o resumo destes artigos.

10 ANEXO

Folha contendo a aprovação do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté (CEEa/UNITAU nº 025/08), sob protocolo nº 026/2005.

