

**PATRÍCIA LÚCIO ALVES**

**COMPARAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E  
FUNCIONALIDADE DE ILHOTAS  
PANCREÁTICAS, SOB EFEITO DA EXENATIDA,  
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE  
E DIABETES MELITO NO RATO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação  
em Ciências do Instituto  
Butantan, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

**São Paulo  
2015**

**PATRÍCIA LÚCIO ALVES**

**COMPARAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO E  
FUNCIONALIDADE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS, SOB  
EFEITO DA EXENATIDA, EM MODELOS EXPERIMENTAIS  
DE OBESIDADE E DIABETES MELITO NO RATO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Ciências do Instituto Butantan, para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências.

Orientador: Dr. Paulo Flavio Silveira

**São Paulo**

**2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Patrícia Lúcio

Comparação do perfil metabólico e funcionalidade de ilhotas pancreáticas, sob efeito da exenatida, em modelos experimentais de obesidade e diabetes melito no rato / Patrícia Lúcio Alves; orientador Paulo Flávio Silveira. – São Paulo, 2015.

129 folhas. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Instituto Butantan, 2015.

1. Obesidade. 2. Diabetes Melito. 3. Peptídeos. 4. Veneno. 5. Lagarto. I. Orientador (Silveira, Paulo Flavio, orient.). II. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

São Paulo, 18 de Fevereiro de 2015

## **AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO**

Eu, Patrícia Lúcio Alves, aluna regular de Pós-Graduação do Instituto Butantan, em nível de Mestrado, venho por meio desta, autorizar a divulgação da dissertação cujo título é: “Comparação do perfil metabólico e funcionalidade de ilhotas pancreáticas, sob o efeito da exenatida, em modelos experimentais de obesidade e diabetes melito no rato”, em arquivo tipo pdf no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

---

Patrícia Lúcio Alves

De acordo:

---

Dr. Paulo Flavio Silveira  
Orientador

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
INSTITUTO BUTANTAN**

**RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**MESTRADO**

**NOME DA ALUNA:** Patrícia Lúcio Alves

**DATA DO EXAME:**...../..... /.....

**BANCA EXAMINADORA:** Profs. Drs.

<b>NOME</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Aprovada</b>	<b>Reprovada</b>
_____	_____	( )	( )
(Presidente)			
_____	_____	( )	( )
_____	_____	( )	( )

**DECISÃO FINAL:** APROVADA ( )      REPROVADA ( )

**Comentários da Banca (opcional):**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

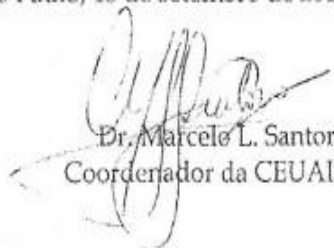
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505  
ceuaib@butantan.gov.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Comparação do perfil metabólico, características de receptores muscarínicos no hipocampo e funcionalidade de ilhoas de Langerhans sob efeito da exenatida em modelos experimentais de obesidade e diabetes melito no rato", protocolo nº 953/12, sob a responsabilidade de Paulo Flávio Silveira - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/9/2012.

Vigência do Projeto: 09/2012 - 08/2014	Nº de animais/espécie
Laboratório de Farmacologia	250 ratos Wistar recém nascidos (M); 25 ratos Wistar adultas (F); 94 ratos Wistar 72-75 dias (M)

São Paulo, 13 de setembro de 2012

  
Dr. Marcelo L. Santoro  
Coordenador da CEUAIB

Dedico essa dissertação a todos que acreditam em meu trabalho. Aos meus pais, Leni e Paulo, à minha irmã Kamila, à minha tia Sandra, ao meu orientador Prof. Dr. Paulo, meus amigos e familiares.

Obrigada!!!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me guiar nesta caminhada e atingir mais este objetivo.

Aos meus pais **Benedita Leni Lúcio Alves e Paulo Sérgio Alves** por estarem sempre do meu lado, apoiando as minhas idéias, aconselhando, amando e por estarem sempre presentes, apesar desta distância. Amo muito vocês!!

À minha irmã **Kamila Lúcio Alves** por ver os mesmos eternos filmes prediletos sem cansar, pela descontração e pelo amor. À minha tia madrinha **Sandra Valéria Lúcio** pelas várias conversas sobre a vida, por ser essa pessoa que ama educar e foi meu exemplo como educadora. Amo muito vocês!!!

Ao meu orientador **Dr. Paulo Flávio Silveira** pela orientação, por acreditar em meu trabalho, pelo exemplo de competência e profissionalismo.

À minha co-orientadora **Dra. Rafaela Fadoni Alponi Vendrame** pela amizade, pelo carinho, pelas batalhas nas madrugadas em escrever e corrigir, pessoa essencial nesta minha caminhada como profissional, além de uma grande amiga. Desculpe pelos momentos de surto. À **MSc. Mariana Trivilin Mendes e MSc. Rodrigo Frezzatti** por sempre me ajudarem com minhas dúvidas, ouvindo várias e várias vezes a minha apresentação e pelos momentos de risos. Sem essa equipe este projeto não seria o mesmo!!!

Aos amigos da Farmacologia presentes ou não: **MSc. Luciana Godoy, Eduardo Manzo, Aline Oliveira, Luana Baracho, MSc. Karen Homem, Marcelo Florêncio, MSc. Roberta Santos, MSc. Adriana Martins, MSc. Lucas Alves, MSc. Márcio Matsubara, MSc. Marlos Cortez, MSc. Eduardo Frare, MSc. Karina Gianotti, MSc. Mariana Viana, MSc. Ana Eduarda Zulim, Livia Rocha, Anne Kaline Marina Nogueira** pela companhia, descontração, conselhos e carinho.

Aos amigos que encontrei em São Paulo e do Instituto Butantan, que fazem a minha vida nesta cidade mais feliz! Principalmente as minhas amigas irmãs:



**Priscilla Bastos, Isabela Maciel Soriano, Heloisa Matsumoto, Marina Lazarim, Clara Lazarim, Anna Souza, MSc. Rafaela Ferrari.**

Aos amigos de Piracicaba e espalhados por várias cidades por perdoarem e compreenderem as minhas faltas em momentos especiais!!! Amo demais!!

À **Dra. Maria Esméria Corezolla do Amaral**, da UNIARARAS, pelo auxílio e o retorno às minhas dúvidas e pelo aprendizado na graduação, agradeço demais pelo carinho até hoje.

À **MSc. Camila Lucena**, do ICB-USP, pelo enorme auxílio com o isolamento de ilhotas pancreáticas e sempre preocupada em ajudar e ensinar.

Ao **Dr. Fábio Bessa Lima**, do ICB-USP, agradeço por aceitar ser meu docente de acompanhamento e pelas conversas sobre protocolos.

Ao estatístico **Luiz Silva dos Santos**, do Instituto de Psicologia USP, por nos atender e auxiliar com a análise estatística.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial a **Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo, Ana Luiza Pereira da Silva Bettoni, Joana Darc Carvalho Vieira.**

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e pela companhia em mais um sonho realizado!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por meio do auxílio à pesquisa nº 2012/12105-9, outorgado ao Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira, que tornou possível o desenvolvimento deste projeto.

Ao **Programa de pós-graduação em Ciências do Instituto Butantan.**

## EPÍGRAFE

“Por que fazer Ciência? A primeira razão para se fazer Ciência é ter uma paixão declarada pela natureza, um desejo insaciável de desbravar os mistérios do mundo natural.”

Marcelo Gleiser

## RESUMO

**Comparação do perfil metabólico e funcionalidade de ilhotas pancreáticas, sob efeito da exenatida, em modelos experimentais de obesidade e diabetes melito no rato. 129f. Dissertação (Ciências). Instituto Butantan, 2015.**

A exenatida, peptídeo sintético da exendina-4 isolada do veneno do lagarto *Heloderma suspectum*, está entre os mais recentes recursos farmacológicos para o tratamento do diabetes melito tipo 2 (DM2), apresentando ação agonista do receptor do hormônio peptídico glucagon-símile tipo 1 (GLP-1) e resistência à hidrólise pela dipeptidil-peptidase IV (DPPIV). Há evidências de que este fármaco também seja eficaz na redução da ingestão de alimento e do peso corporal. Todavia, não estão completamente caracterizadas suas ações diferenciais sobre o perfil metabólico e morfométrico em modelos animais de DM induzido por estreptozotocina (STZ) e de obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) e dieta hipercalórica (DIO). O presente estudo comparou estes modelos em relação ao ganho de massa corporal (MC) e comprimento naso-anal (CNA), índice de Lee, ingestão de alimento e líquido, tolerância oral à glicose (OGTT), tolerância à insulina (ITT), massa dos depósitos de tecidos adiposos periepididimal e retroperitoneal, glicemia de jejum, triglicérides (TG), colesterol (total, HDL, LDL e VLDL), hemoglobina glicada (HbA1c), proteína plasmática, osmolalidade plasmática, glucagon e insulina secretados pelas ilhotas isoladas, e quanto aos efeitos da exenatida sobre todos estes parâmetros (STZ-E, MSG-E, DIO-E). Comparativamente aos controles sadios (C-S), o grupo DIO apresentou ganho de MC e CNA, maiores índice de Lee, massa do depósito adiposo retroperitoneal, glicemia de jejum, TG, colesterol total, VLDL e HbA1c, bem como menores ingestão de alimentos, taxa de decaimento de glicose (Kitt). O grupo MSG apresentou maiores índice de Lee, massa dos depósitos adiposos retroperitoneal e periepididimal, glicemia de jejum, TG, LDL e VLDL, bem como menores ingestões de alimento e líquido, Kitt e de proteína plasmática, relativamente a C-S. O grupo STZ apresentou menores ganho de MC, massa dos depósitos adiposos periepididimal e retroperitoneal, insulina secretada e maiores HDL, glicemia de jejum e HbA1c, bem como menores tolerância à glicose e insensibilidade à insulina, relativamente a C-S.

Utilizando dose terapêutica para humanos, o tratamento com exenatida, por 20 dias consecutivos, teve efeitos benéficos em parâmetros metabólicos e morfométricos relevantes nos grupos estudados, principalmente no DIO-E, onde o ganho de MC, ingestão de alimento, massa do depósito adiposo retroperitoneal, glicemia de jejum, HbA1c, TG, VLDL e colesterol total foram diminuídos além de haver melhora da sensibilidade à insulina. Em MSG-E houve melhora da glicemia de jejum, insulina secretada e da sensibilidade à insulina. Em STZ-E houve melhora da glicemia de jejum e HbA1c, sem alterar a secreção de insulina e glucagon. Esses dados contribuem com o conhecimento da farmacologia e fisiologia comparativa de componentes de venenos animais e para elucidar novos mecanismos relacionados à etiologia e desenvolvimento da obesidade, bem como para a prevenção e tratamento da obesidade e do DM.

**Palavras-chave:** Obesidade; Diabetes melito; Peptídeos; Veneno; Lagarto.

## ABSTRACT

**Comparison of the metabolic profile and functionality of pancreatic islets, under the effect of exenatide, in experimental models of obesity and *diabetes mellitus* in rats. 129p. Dissertation (Science). Butantan Institute, 2015.**

Exenatide, a synthetic exendin-4 peptide isolated from the venom of *Heloderma suspectum* lizard is among the most recent pharmacological resources for the treatment of type 2 *diabetes mellitus* (DM2), with agonist effect on the receptor of glucagon-like type 1 peptide hormone (GLP-1), and resistance to the hydrolysis by dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV). This drug has also been suggested as effective in reducing food intake and body weight. However, its differential action on the metabolic and morphometric profiles in animals models of DM induced by streptozotocin (STZ) and obesity induced by monosodium glutamate (MSG) or high calorie diet (DIO) is not fully understood. The present study compared these models in relation to the gain of body weight (MC), as well as naso-anal length (CNA), Lee index, food and fluid intake, oral glucose tolerance (OGTT), insulin tolerance (ITT), mass of periepididymal and retroperitoneal fat pads, preprandial glucose, triglycerides (TG), cholesterol (total, HDL, LDL and VLDL), glycated hemoglobin (HbA1c), plasma protein, plasma osmolality, glucagon and insulin secreted by isolated islets, and about the effects of exenatide on all these parameters (STZ-E, MSG-E, DIO-E). DIO presented higher MC and CNA gain, Lee index, mass of retroperitoneal fat pad, preprandial glucose, TG, total cholesterol, VLDL and HbA1c, as well as lower food intake, glucose disappearance rate for ITT (Kitt) than healthy control (C-S). MSG presented higher Lee index, mass of retroperitoneal and periepididymal fat pads, preprandial glucose, TG, LDL and VLDL, as well as lower food and fluid intake, Kitt and plasma protein than C-S. STZ presented lower MC gain, mass of periepididyma and retroperitoneal fat pad, secreted insulin, tolerance to glucose and insensitivity to insulin, as well as higher HDL, preprandial glucose and HbA1c than C-S. The treatment with exenatide, for 20 consecutive days at human therapeutic dose, had beneficial effects on important metabolic and morphometric parameters in all groups, mainly in DIO-E, where it decreased MC gain, food intake,

mass and retroperitoneal fat pad, preprandial glucose, HbA1c, TG, VLDL, total cholesterol and promoted insulin sensitivity. In MSG-E the preprandial glucose and secreted insulin were increased, and the insulin sensitivity was ameliorated. In STZ-E was increased and preprandial blood glucose and HbA1c were ameliorated without changing in the secretion of insulin and glucagon. Data contribute to the knowledge of the comparative pharmacology and physiology of compounds from animal venoms and to elucidate new mechanisms involved in the etiology and development of obesity, as well as to the prevention and treatment of obesity and DM.

**Keywords:** Obesity; *Diabetes mellitus*; Peptides; Venom; Lizard.

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>DM</b>	Diabetes melito
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>DM1</b>	Diabetes melito tipo 1
<b>DMID</b>	Diabetes melito insulino-dependente
<b>DM2</b>	Diabetes melito tipo 2
<b>DMNID</b>	Diabetes melito não-insulino-dependente
<b>GLP-1</b>	Peptídeo glucagon-símile tipo 1
<b>GLP-2</b>	Peptídeo glucagon-símile tipo 2
<b>GLP-1R</b>	Receptor do GLP-1
<b>GIP</b>	Peptídeo insulino-trópico glicose-dependente
<b>DPPIV</b>	Dipeptidil peptidase IV
<b>VIP</b>	Peptídeo intestinal vasoativo
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicada
<b>PI3-q</b>	Fosfatidilinositol-3-quinase
<b>Akt</b>	Proteína quinase B
<b>C-S</b>	Controle - Sadio
<b>MSG</b>	Glutamato monossódico / Animais que desenvolveram obesidade hipotalâmica
<b>MSG-E</b>	Glutamato monossódico / Animais que desenvolveram obesidade hipotalâmica e tratados com exenatida
<b>DIO</b>	Dieta hipercalórica / Animais que desenvolveram obesidade dietética
<b>DIO-E</b>	Dieta hipercalórica / Animais que desenvolveram obesidade dietética e tratados com exenatida
<b>STZ</b>	Estreptozotocina / Animais que desenvolveram diabetes melito
<b>STZ-E</b>	Estreptozotocina / Animais que desenvolveram diabetes melito e tratados com exenatida
<b>GLUT 2</b>	Transportador de glicose tipo 2

<b>GLUT 4</b>	Transportador de glicose tipo 4
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>OGTT</b>	Teste de tolerância oral à glicose
<b>ITT</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>Kitt</b>	Taxa de decaimento da glicose
<b>TG</b>	Triglicerídeos
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muita baixa densidade
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidade intermediária
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipase
<b>DCCT</b>	Diabetes Control and Complications Trial
<b>UKPDS</b>	United Kingdom Prospective Diabetes Study
<b>CEUAIB</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
<b>sc</b>	via subcutânea
<b>ip</b>	via intraperitoneal
<b>MC</b>	Massa Corporal
<b>CNA</b>	Comprimento Naso-Anal
<b>Ln</b>	Logarítimo natural
<b>BSA</b>	Albumina do Soro Bovino
<b>NTS</b>	Núcleo do Trato Solitário



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ações do GLP-1 e os órgãos-alvo. O GLP-1, por meio de seu receptor de GLP-1R, tem efeitos funcionais sobre uma variedade de tecidos. (CECCARELLI *et al.*, 2013). .....30
- Figura 2.** *Heloderma suspectum* (Monstro-de-Gila). (a) *Heloderma suspectum cinctum*; (b) *Heloderma suspectum suspectum* (BIOLIB site, 2014). .....31
- Figura 3.** Fotomicrografia de ilhotas pancreáticas do rato, em corte histológico transversal, coradas com tricômio de Gomori (indicadas por setas vermelhas). Aumento de 200x. ....50
- Figura 4.** Aspecto de ilhota pancreática isolada de rato. Aumento de 100x. ....51
- Figura 5.** Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9) em relação ao primeiro dia de indução.....52
- Figura 6.** Percentual de aumento de CNA dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9) em relação ao primeiro dia de indução.....53
- Figura 7.** Índice de Lee dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9).....54
- Figura 8.** Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9)...55
- Figura 9.** Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9).....56
- Figura 10.** Glicemia de jejum (a) e AUC (b) do Teste de Tolerância Oral à Glicose dos animais controles saudáveis (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....57

<b>Figura 11.</b> Glicemia de jejum (a) e Kitt (b) do Teste de Tolerância à Insulina dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	58
<b>Figura 12.</b> Massa do tecido adiposo periepídídimal dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	59
<b>Figura 13.</b> Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	59
<b>Figura 14.</b> Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	60
<b>Figura 15.</b> TG dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E)..	60
<b>Figura 16.</b> Colesterol total dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).	61
<b>Figura 17.</b> HDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E)..	61
<b>Figura 18.</b> LDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E)..	62
<b>Figura 19.</b> VLDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).	62
<b>Figura 20.</b> HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	63

<b>Figura 21.</b> Proteína plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E)..	63
<b>Figura 22.</b> Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E)..	64
<b>Figura 23.</b> Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	64
<b>Figura 24.</b> Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E).....	65
<b>Figura 25.</b> Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0)..	66
<b>Figura 26.</b> Percentual de ganho de CNA dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0). ..	67
<b>Figura 27.</b> Índice de Lee dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtido a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida).....	68
<b>Figura 28.</b> Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtida a partir da segunda semana após o desmame (4ª semana de vida). .	69
<b>Figura 29.</b> Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtida a partir da segunda semana após o desmame (4ª semana de vida).....	70

<b>Figura 30.</b> Glicemia de jejum (a) e AUC (b) do Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	71
<b>Figura 31.</b> Glicemia de jejum (a) e Kitt (b) do Teste de Tolerância à Insulina (ITT) dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	72
<b>Figura 32.</b> Massa do tecido adiposo periepídídimal dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	73
<b>Figura 33.</b> Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	73
<b>Figura 34.</b> Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). ....	74
<b>Figura 35.</b> TG dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	74
<b>Figura 36.</b> Colesterol total dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	75
<b>Figura 37.</b> HDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E) .....	75
<b>Figura 38.</b> LDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	76

<b>Figura 39.</b> VLDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	76
<b>Figura 40.</b> HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E)....	77
<b>Figura 41.</b> Proteína plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	77
<b>Figura 42.</b> Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	78
<b>Figura 43.</b> Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	78
<b>Figura 44.</b> Secreção de insulina de ilhotas pancreática isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E).....	79
<b>Figura 45.</b> Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7) e STZ-E (n=10) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0).....	80
<b>Figura 46.</b> Percentual de ganho de CNA dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7) e STZ-E (n=10) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0).....	81
<b>Figura 47.</b> Índice de Lee dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtido a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida). ....	82

<b>Figura 48.</b> Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtida a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida).....	83
<b>Figura 49.</b> Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtida a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida).....	84
<b>Figura 50.</b> Glicemia de jejum (a) e AUC (b) do Teste de Tolerância à Glicose (OGTT) dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	85
<b>Figura 51.</b> Glicemia de jejum (a) e Kitt (b) do Teste de Tolerância à Insulina (ITT) dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E)..	86
<b>Figura 52.</b> Massa do tecido adiposo periepídídimal dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	87
<b>Figura 53.</b> Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	87
<b>Figura 54.</b> Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E)..	88
<b>Figura 55.</b> TG dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	88
<b>Figura 56.</b> Colesterol total dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E)..	89
<b>Figura 57.</b> HDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E)..	89

<b>Figura 58.</b> LDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). .....	90
<b>Figura 59.</b> VLDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). .....	90
<b>Figura 60.</b> HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).. .....	91
<b>Figura 61.</b> Proteína plasmática dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).. .....	91
<b>Figura 62.</b> Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).. .....	92
<b>Figura 63.</b> Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	92
<b>Figura 64.</b> Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E).....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de mortalidade, exclusão e efetividade durante o período experimental.....	50
<b>Tabela 2.</b> MC absoluta e CNA dos grupos C-S de DIO no início do experimento (1ª semana).....	51
<b>Tabela 3.</b> MC absoluta e CNA dos grupos C-S de MSG na primeira semana após o desmame (4ª semana).....	65
<b>Tabela 4.</b> MC absoluta e CNA dos grupos C-S de STZ na primeira semana após o desmame (4ª semana).....	79
<b>Tabela 5.</b> Comparação dos valores dos parâmetros morfométricos e metabólicos entre os modelos de obesidade MSG e DIO .....	94



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1. Obesidade e Diabetes Melito</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2. Peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1) e peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP)</b> .....	<b>29</b>
<b>1.3. <i>Heloderma suspectum</i> (Monstro-de-Gila)</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4. Fármacos agonistas do receptor de GLP-1 e resistentes à hidrólise pela DPP-IV</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5. Modelos experimentais de obesidade e DM</b> .....	<b>32</b>
1.5.1. Indução da obesidade pelo ácido L-glutâmico sal monossódico (MSG) .....	32
1.5.2. Indução da obesidade por dieta rica em gordura e açúcar (dieta de cafeteria – DIO) .....	33
1.5.3. Indução da DM pela ablação química da produção de insulina (STZ) .....	33
<b>1.6 Parâmetros morfométricos e metabólicos</b> .....	<b>34</b>
1.6.1. MC, CNA, Índice de Lee e adiposidade .....	34
1.6.2. Ingestão de líquido e alimento .....	35
1.6.3. Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT) .....	35
1.6.4. Teores de TG e colesterol (total, LDL, HDL e VLDL) .....	36
1.6.5. Osmolalidade plasmática, proteína plasmática e HbA1c .....	37
1.6.6. O pâncreas e as ilhotas pancreáticas .....	39
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1. Gerais</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2. Específicos</b> .....	<b>42</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1. Animais e tratamento</b> .....	<b>43</b>
4.1.1. Obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) .....	43
4.1.2. Obesidade dietética (DIO) .....	44
4.1.3. DM induzido por estreptozotocina (STZ) .....	44
<b>4.2. Ingestão de alimento e líquido</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3. MC, CNA, Índice de Lee e adiposidade</b> .....	<b>45</b>

4.4.	OGTT e ITT .....	46
4.5.	Obtenção do plasma e teores de TG e colesterol (total, LDL, HDL e VLDL) .....	46
4.6.	Osmolalidade plasmática, proteína plasmática e HbA1c .....	47
4.7.	Isolamento de ilhotas pancreáticas .....	47
4.8.	Incubação de ilhotas pancreáticas .....	48
4.9.	Teores de insulina e glucagon .....	48
4.10.	Análise e apresentação dos dados .....	49
5.	RESULTADOS .....	50
5.1.	Mortalidade, exclusão e efetividade dos tratamentos .....	50
5.2.	DIO .....	51
5.3.	MSG .....	65
5.4.	STZ .....	79
5.5.	Comparação dos parâmetros morfométricos e metabólicos entre os modelos de obesidade MSG e DIO .....	93
6.	DISCUSSÃO .....	95
6.1.	Parâmetros morfométricos e metabólicos .....	95
6.1.1.	DIO .....	95
6.1.2.	MSG .....	100
6.1.3.	STZ .....	102
6.2.	Comparação das alterações, sob estudo, entre os modelos de obesidade MSG e DIO .....	104
6.3.	Efeitos da exenatida na obesidade e DM .....	105
6.4.	Sumário dos resultados .....	106
7.	CONCLUSÕES .....	108
8.	PERSPECTIVAS .....	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade e Diabetes Melito

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. Segundo a WHO (2015), em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, acima dos 18 anos, estavam acima do peso e, deste total, mais de 600 milhões eram obesos. Com relação à obesidade infantil, em 2013, 42 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos encontravam-se acima do peso ou já apresentavam obesidade (WHO, 2015). O desenvolvimento da obesidade é influenciado por diversos fatores biológicos e psicossociais, incluindo predisposição genética, disfunções endócrinas e padrões dietéticos (HALPERN e MANCINI, 1996). Desde a descoberta da leptina, o produto do gene *ob* (ZHANG *et al.*, 1994), os estudos desta doença convergem para a tentativa de identificar os substratos moleculares e sinalizadores metabólicos relacionados, principalmente, com a motivação para a ingestão de alimento. As consequências do desequilíbrio energético na obesidade englobam doenças cardiovasculares, desordens musculoesqueléticas, alguns cânceres e o diabetes melito (DM). Segundo a International Diabetes Federation (IDF, 2005), a síndrome metabólica ou plurimetabólica, chamada anteriormente de síndrome X, caracterizada pela associação de fatores de risco para as doenças vasculares e cardíacas, possui uma estreita relação com hipercolesterolemia, pré-DM, DM e obesidade visceral.

A DM é uma doença complexa, com diferentes tipos e graus, em que ocorrem modificações importantes na interação metabólica entre órgãos e cuja disfunção marcante é a hiperglicemia crônica, especialmente em consequência do desequilíbrio entre a produção, sinalização e a secreção de insulina. A deficiência ou a ausência da produção de insulina, que podem ser provenientes de danos virais, doenças autoimunes às células beta-pancreáticas ou hereditariedade, caracterizam o quadro de DM tipo 1 (DM1, ou DM insulino dependente [DMID]), enquanto que problemas da via de sinalização e a disfunção dos receptores de insulina, tornando-os insensíveis a este hormônio, caracterizam o DM tipo 2 (DM2, ou DM não-insulino dependente [DMNID]) (GINSBERG e MACCALLUM, 2009). O DM1

geralmente se manifesta em pessoas com menos de 30 anos e tem como principais fatores de risco doenças autoimunes, infecções virais e antecedentes familiares. O DM2 ocorre devido ao excesso de peso e, além desse, tem como principais fatores de risco o estresse psicológico ou emocional, gestação, certos medicamentos, idade acima de 40 anos e antecedentes familiares. De particular interesse é a interação da insulina com reguladores anabólicos e catabólicos. Esta interação abrange vários níveis, por meio de sinais endócrinos e neurais, em grande parte exercidos por peptídeos e integrados, principalmente, pelo hipotálamo. Atualmente, há um novo conceito na etiopatogenia do DM2, o qual propõe que a combinação de disfunções das células beta-pancreáticas e resistência à insulina, não somente nos seus tecidos-alvos clássicos, contribui para a doença. Neste sentido, destaca-se a importância da interrupção da transmissão do sinal de insulina cerebral e sua relação direta com doenças metabólicas. A deficiência nesta sinalização é um elo entre a obesidade e o DM. No entanto, paradoxalmente, as abordagens atuais usadas para a prevenção e tratamento do DM2 induzem muitos efeitos adversos, em particular a própria obesidade e, portanto, podem dar início a um ciclo vicioso de problemas (GEROZISSIS, 2008; ASHCROFT e RORSMAN, 2012). Em modelos experimentais (administração intracerebral de estreptozotocina) tem sido evidenciado um suposto tipo de DM, denominado "tipo 3" (STEEN *et al.*, 2005), em que os níveis de glicose no sangue não são elevados e a arquitetura pancreática e imunorreatividade para a insulina são semelhantes aos dos controles normais, enquanto o cérebro é reduzido em tamanho e mostra sinais de degeneração associada à perda celular e anomalias nos mecanismos de sinalização da insulina e somatomedinas C (IGF-1) e A (IGF-2) (LESTER-COLL *et al.*, 2006; ARAB *et al.*, 2011). O número de portadores de DM em 2011 no Brasil era de aproximadamente 12,4 milhões. Para 2030, a previsão mundial é de 552 milhões (IDF, 2011). Destes, 2% se tornam cegos e 10% adquirem graves problemas visuais devido à retinopatia; 50% apresentam neuropatias (*e.g.* dores e fraqueza nas extremidades); 10-20% morrem por falência renal; e 50% morrem de doença cardiovascular; cerca de 4,6 milhões morreram por causa do DM em 2011 (IDF, 2011). A WHO projeta para 2015 um aumento de 50% nesse índice de mortalidade. Esses dados epidemiológicos são suficientes para explicar a intensa busca por agentes que combatam a síndrome

metabólica, reduzindo os elevados índices de mortalidade para as doenças relacionadas.

## **1.2 Peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1) e peptídeo insulíntrópico glicose-dependente (GIP)**

O GLP-1 e o GIP são as principais incretinas do organismo humano. São hormônios intestinais secretados em resposta à ingestão de nutrientes, o que estimula a secreção de insulina dependente de glicose. Até dois terços da insulina normalmente secretada em resposta à ingestão de alimento são devidas à ação insulíntrópica do GLP-1 e GIP (NISWENDER, 2010; KASAKO, 2011). O GIP é um peptídeo produzido nas células enteroendócrinas K (KASAKO, 2011). O hormônio GLP-1 é um produto do processamento pós-traducional da molécula do pró-glucagon, que além de GLP-1 contém o peptídeo glucagon-símile tipo 2 (GLP-2) e glucagon. O GLP-1 é produzido pelas células enteroendócrinas L presentes no íleo distal e no cólon, e secretado na corrente sanguínea, na forma reduzida GLP-1 (7-36), quando há nutrientes no duodeno, após esvaziamento gástrico (GORRELL, 2005; DOYLE e EGAN, 2007; NISWENDER, 2010). Os níveis plasmáticos normais de GLP-1 pré-prandiais estão entre 5-10 pmol/L e pós-prandiais entre 15-50 pmol/L (KASAKO, 2011). Além da ação insulíntrópica, o GLP-1 inibe a secreção de glucagon, retarda o esvaziamento gástrico, induz a saciedade e promove o aumento da massa de células beta-pancreáticas, bem como sua resistência à apoptose (Figura 1) (DRUCKER e NAUCK, 2006). É importante destacar que, fisiologicamente, o GLP-1 não causa hipoglicemia, pois ele não estimula a secreção de insulina, exceto se a glicemia alcançar nível maior que cerca de 5 mM (CLAUS *et al.*, 2007). Desta forma, ele traz benefícios terapêuticos no DM2. No entanto, sua meia-vida é de menos de 3 minutos, sendo a enzima dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) a principal responsável por seu catabolismo.

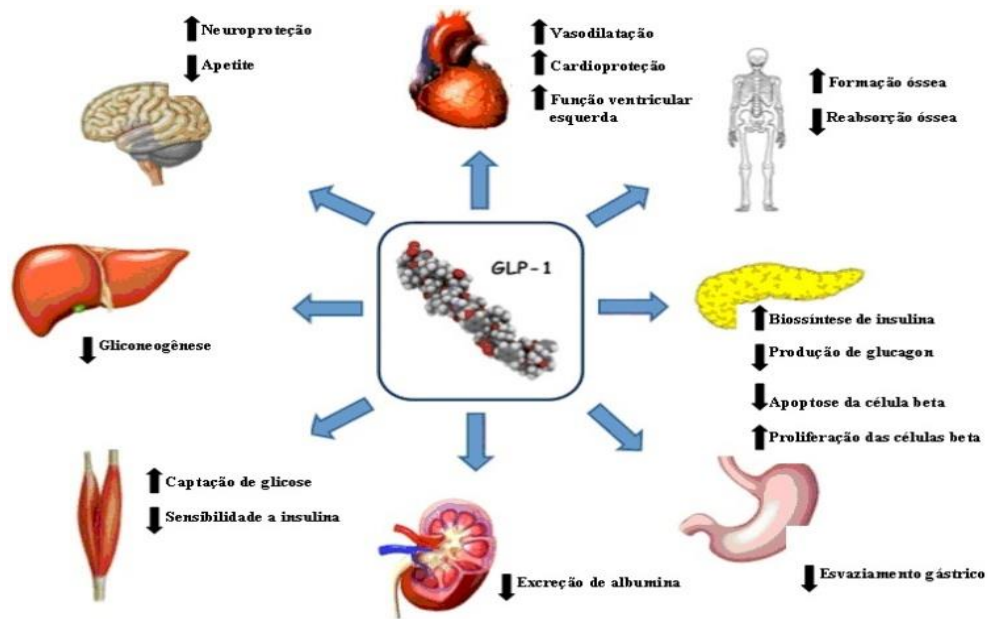


Figura 1. Ações do GLP-1 e os órgãos-alvo. O GLP-1, por meio de seu receptor (GLP-1R), tem efeitos funcionais sobre uma variedade de tecidos. (CECCARELLI *et al.*, 2013).

### 1.3 *Heloderma Suspectum* (Monstro-de-Gila)

O *Heloderma suspectum* é o principal lagarto dos Estados Unidos (RUSSELL e BOGERT, 1981), e uma das poucas espécies de lagartos venenosos do mundo (CHEN e DRUCKER, 1997; FRY *et al.*, 2006), sendo encontrado também no México. Ele possui língua bifurcada, corpo atarracado com aproximadamente 60 centímetros de comprimento e uma cauda curta (RUSSELL e BOGERT, 1981). A pele é composta por escamas ósseas, uma característica incomum nos répteis atuais (RUSSELL e BOGERT, 1981). Padrões distintos de coloração, sob fundo preto, distinguem as duas subespécies: o *Heloderma suspectum cinctum* (Figura 2a) possui, ao longo do dorso, faixas paralelas, e o *Heloderma suspectum suspectum* (Figura 2b) possui manchas, com padrão reticulado de coloração rosa ou alaranjada (RUSSELL e BOGERT, 1981).

A saliva venenosa é produzida em glândulas salivares modificadas, localizadas no maxilar inferior, ao contrário das serpentes, cujo veneno é produzido no maxilar superior (RUSSELL e BOGERT, 1981). O *Heloderma suspectum* não possui musculatura necessária para forçar a inoculação do veneno, o qual é impelido da glândula para o dente através da mastigação (RUSSELL e BOGERT, 1981). O veneno é transportado para a área externa do dente, onde entrará em

contato com a presa, por meio de um canal (RUSSELL e BOGERT, 1981). Se ameaçados, promovem um ataque rápido e sua mordida é relatada como extremamente dolorosa para os seres humanos, podendo acarretar óbito, o que parece ser raro (RUSSELL e BOGERT, 1981).



**Figura 2.** *Heloderma suspectum* (Monstro-de-Gila). (a) *Heloderma suspectum cinctum*; (b) *Heloderma suspectum suspectum* (BIOLIB site, 2014).

#### **1.4 Fármacos agonistas do receptor de GLP-1 e resistentes à hidrólise pela DPPIV**

Partindo de observações de que o veneno do monstro-de-Gila (*Heloderma suspectum*) estimula, *in vitro*, a secreção pancreática (RAUFMAN *et al.*, 1982), chegou-se a descoberta, neste veneno, de peptídeos estruturalmente análogos ao peptídeo intestinal vasoativo (VIP) – ação hipotensora – e à secretina. São esses os peptídeos helospectina-1, helospectina-2 (PARKER *et al.*, 1984) e helodermina (HOSHINO *et al.*, 1984). No mesmo veneno, o peptídeo exendina-4 foi isolado e mostrou-se agonista do receptor de GLP-1 (GLP-1R), possuindo assim as mesmas ações do GLP-1 endógeno, com a vantagem de ser resistente à degradação enzimática pela DPPIV (DOYLE e EGAN, 2007), o que proporciona uma meia-vida maior que a observada para o GLP-1, assim prolongando os efeitos antidiabetogênicos (GIORGINO *et al.*, 2006). Nesse sentido, a exendina-4 foi transformada no medicamento exenatida (Byetta®) (Amylin-Lilly). O Byetta®, Victoza® (liraglutida, Novo Nordisk) (análogo da exenatida com 97% de similaridade estrutural com o GLP-1), Bydureon® (Amylin Pharmaceuticals) (exenatida de liberação prolongada por microesferas biodegradáveis) e a Lyxumia® (Lixisenatida, Sanofi) (versão sintética e modificada da exendina-4, da qual foi removido o resíduo de prolina e adicionados seis resíduos de lisina na porção C terminal) são

atualmente considerados os recursos farmacológicos mais eficientes (maior eficácia e menor risco) para o DM2 (DRUCKER e NAUCK, 2006; KENDALL *et al.*, 2009; PAINTER, *et al.*, 2013; SHELLEY e KEATING, 2013). Estudos recentes mostram que a administração de exenatida promove a redução da ingestão de alimento e a redução de peso em indivíduos obesos (HAYES *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2013), bem como a melhora de alterações celulares em modelos de DM relacionados à doença de Alzheimer (CHEN *et al.*, 2012). Há relatos de que 10 µg de exenatida, administrada duas vezes ao dia, resulta numa redução de 0,9% de hemoglobina glicada (HbA1c) de pacientes diabéticos, dentre os quais 60% alcançaram níveis menores que 7% (KASAKO, 2011). Em testes clínicos, 40-50% dos pacientes produziram anticorpos (baixa titulação, 1/125) contra a exenatida, mas com baixa avides, o que parece não prejudicar sua eficiência terapêutica (DEFRONZO *et al.*, 2005).

## **1.5 Modelos experimentais de obesidade e DM**

### **1.5.1 Indução da obesidade pelo ácido L-glutâmico sal monossódico (MSG)**

O hipotálamo desempenha papel central no controle da ingestão de alimento e homeostase energética. Está comprovado que a destruição de centros hipotalâmicos específicos induz o que, classicamente, se define como obesidade hipotalâmica ou “central” (BRAY *et al.*, 1981; WYNNE *et al.*, 2005). Sabe-se que na evolução para o estágio mais grave da obesidade ocorre neuroinflamação, com aumento da apoptose neuronal (WILLIAMS, 2012; PURKAYASTHA e CAI, 2013), a qual o modelo de administração neonatal de MSG mimetiza. Essa administração é reconhecida por produzir lesões no núcleo arqueado e na eminência mediana, por meio de excitotoxicidade (LEIGH *et al.*, 1992; DOLNIKOFF *et al.*, 2001). Após repetidas doses de MSG, os animais tornam-se obesos na vida adulta, segundo parâmetros biométricos como o índice de Lee (BERNARDIS e PATTERSON, 1968; NAKAGAWA *et al.*, 2000) e a medida de hipertrofia adipocítica (NEMEROFF *et al.*, 1978; DOLNIKOFF *et al.*, 2001). O índice de Lee é a razão entre massa corporal (MC) e o comprimento naso-anal (CNA) (BERNARDIS e PATTERSON, 1968; NAKAGAWA *et al.*, 2000). A hipertrofia (ou hiperplasia) adipocitária pode ser



reconhecida por meio da medida de massa dos depósitos de gordura periepídídima e retroperitoneal (BERNARDIS e PATTERSON, 1968; MACHO *et al.*, 2000). Em relação aos animais normais, aqueles que recebem tratamento com MSG vêm sendo descritos como apresentando menor crescimento e MC absolutos, enquanto são maiores os depósitos de gordura e a MC relativamente ao tamanho (KAUFHOLD *et al.*, 2002). Este modelo experimental de obesidade induzida por MSG tem sido caracterizado pela ausência de hiperfagia (BUNYAN *et al.*, 1976) e decréscimo da secreção de hormônio do crescimento (BLOCH *et al.*, 1984; SHAPIRO *et al.*, 1986), bem como hiperinsulinemia (SCALLET e OLNEY, 1986; MATYŠKOVÁ *et al.*, 2008), corticosteronemia, hiperleptinemia (PERELLO *et al.*, 2004; MATYŠKOVÁ *et al.*, 2008) e atrofia da hipófise, gônadas e nervos ópticos (MATYŠKOVÁ *et al.*, 2008). Sob privação de alimento, ratos obesos MSG têm atividade DPPIV plasmática diminuída comparativamente a ratos normais (ALPONTI e SILVEIRA, 2010), a qual, como já comentado, hidrolisa GLP-1, o que permitiria o aumento da disponibilidade desse peptídeo no plasma, por sua vez contribuindo para a diminuição da MC desses animais.

#### 1.5.2 Indução de obesidade por dieta rica em gordura e açúcar (dieta de cafeteria - DIO)

Além dos estudos com base em mutações genéticas, reprodução seletiva e manipulações fisiológicas, é importante a abordagem da obesidade com base na interação dos fatores genéticos e fisiológicos com aspectos ambientais e dietéticos. A tendência dos estudos neste contexto é explorar as respostas de animais experimentais à ingestão de elevadas quantidades de gorduras e açúcar, a denominada dieta de “cafeteria”, tentando mimetizar a situação globalmente disseminada de adesão humana a este tipo de dieta (YUONG e KIRKLAND, 2007; SPEAKMAN *et al.*, 2008). Neste sentido, há ainda o interessante conceito de adição alimentar e a possibilidade de identificar, nestes modelos, os substratos neurais deste fenômeno (AVENA *et al.*, 2008).

#### 1.5.3 Indução da DM pela ablação química da produção de insulina (STZ)

A administração de estreptozotocina (STZ) é um método reconhecidamente eficiente e simples, embora não igualmente eficaz em todos os animais, de promover experimentalmente o DM (TAKADA *et al.*, 2007). As vias endovenosa e intraperitoneal são utilizadas na administração da STZ. Na via intraperitoneal, a STZ é administrada comumente em pH 4,5, em dose única entre 30-90 mg/kg MC (NISHIMURA e KURIYAMA, 1985; AKAISHI e HOMMA 1992; PESCE *et al.*, 1994; TAKAHASHI e OSAWA, 1994; MARTÍN *et al.*, 1995; WAN *et al.*, 2000; ADEGHATE *et al.*, 2001; USTA *et al.*, 2003; WOLD *et al.*, 2003; ZAMBOTTI-VILLELA *et al.*, 2007a, 2007b, 2008).

A STZ, 2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosureído)-D-glicopiranosose, ( $C_8H_{15}N_3O_7$ ), é um análogo da N-acetilglucosamina que apresenta citotoxicidade seletiva para as células beta do pâncreas (HERR *et al.*, 1967). A STZ é rapidamente transportada para o interior das células beta, via transportador de glicose do tipo 2 (GLUT 2) (CARDINAL *et al.*, 1999; SZKUDELSKI, 2012). Os mecanismos pelos quais atua na indução do DM não estão totalmente elucidados (KONRAD *et al.*, 2001). Tem sido proposto que estejam relacionados, entre outros fatores, com a geração de radicais livres, como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, os quais resultam na fragmentação do DNA, estimulando a poli-(ADP ribose)-sintetase nuclear e, então, depletando NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup> intracelulares, os quais inibem a síntese de pró-insulina e induzem o DM (SZKUDELSKI, 2012).

## **1.6 Parâmetros morfométricos e metabólicos**

### **1.6.1 MC, CNA, índice de Lee e adiposidade**

A MC e a adiposidade são os principais parâmetros a serem avaliados em estudos sobre obesidade, pois indicam a efetividade do modelo adotado como indutor da doença. A redução da MC e da massa de tecido adiposo branco (adiposidade) propicia a redução do risco de aparecimento de morbidades associadas à obesidade (DEFRONZO *et al.*, 2005). O índice de Lee pode ser utilizado para indicar o grau de obesidade (BERNARDIS e PATTERSON, 1968; NEMEROFF *et al.*, 1978; SERESS, 1982). Historicamente, em 1929, Lee considerou que a proporção entre MC e o CNA poderia ser utilizada como um indicativo do

estado nutricional saudável em ratos, considerando 0,3 como valor normal. Posteriormente, outros pesquisadores encontraram uma correlação entre esse índice e a porcentagem de gordura corporal e sugeriram que ele poderia ser utilizado como um indicador de obesidade razoavelmente preciso e de rápida obtenção (SZENTAGOTHAI *et al.*, 1962; BERNARDIS e PATTERSON, 1968). O parâmetro adiposidade corresponde à quantidade de tecido adiposo no organismo, sendo representada pela massa de um ou mais depósitos de tecido adiposo, como, por exemplo, o periepídidimo e o retroperitoneal. A leptina e a insulina estão relacionadas com este parâmetro. A produção de leptina pelos adipócitos é regulada pela quantidade de massa de tecido adiposo visceral (retroperitoneal) e subcutâneo. Por sua vez, a insulina potencializa os efeitos da leptina, além de atuar no controle da adiposidade, funcionando de forma distinta no sistema nervoso central (SNC), onde tem ação catabólica, e na periferia, onde tem ação anabólica, porém equilibrada para promover a euglicemia e a composição corporal ideal (NISWENDER *et al.*, 2004).

#### 1.6.2 Ingestão de líquido e alimento

Em estudos com roedores, a administração de GLP-1 reduziu significativamente a ingestão alimentar (VAN DIJK e THIELE, 1999). Esta redução e consequente diminuição do ganho de MC também foram observadas na administração de um análogo de GLP-1, o NN2211, em macacos *rhesus*, em camundongos db/db obesos e ratos diabéticos Zucker (MÉIER *et al.*, 2002).

A ingestão de líquido é um parâmetro importante, visto que sua variação acarreta alterações osmóticas e eletrolíticas no sangue, culminando em problemas renais. Animais diabéticos apresentam polidipsia, a qual se deve à hiperosmolalidade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante. A desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa (LERCO *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2011).

#### 1.6.3 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) e Teste de Tolerância à insulina (ITT)

O OGTT, em humanos, consiste na ingestão oral de 75 g de glicose em cinco minutos, com determinações da glicemia e insulinemia a cada 15 ou 30 minutos, durante 2 ou 3 horas. A razão entre a glicemia e insulinemia, em termos absolutos ou considerando o incremento sobre o basal, é calculada para cada ponto da curva e, também, para toda a curva (AUC = área sobre a curva). Quanto menor o incremento na glicose por unidade de insulina, mais sensível será o indivíduo testado (GELONESE e TAMBASCIA, 2006). Na literatura existem divergências quanto à realização do OGTT em animais experimentais: o tempo de jejum varia entre 6 a 15 horas antes do início do experimento, a sobrecarga de glicose em ratos ou camundongos geralmente varia entre 1g/Kg ou 2g/kg do animal, a duração do experimento entre 2 horas a 3 horas e coleta de sangue, via caudal, em intervalos que podem variar entre 15 a 30 minutos e com o animal experimental não anestesiado (AMARAL *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2012).

As alterações da glicose plasmática de jejum estão relacionadas ao aumento da produção hepática de glicose e à diminuição global da secreção de insulina. Por outro lado, o aumento da glicose plasmática após a sobrecarga oral de glicose depende da diminuição do pico inicial de secreção de insulina, que é um mecanismo da patogênese do DM mais precoce do que a diminuição global da produção de insulina (GROSS *et al.*, 2002).

A primeira técnica desenvolvida para avaliar a sensibilidade à insulina de forma direta *in vivo* foi o ITT. O método mais frequentemente utilizado na atualidade consiste na injeção, em *bolus*, de 1U/Kg de insulina regular, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose (Kitt) ao longo de 15 minutos após a injeção de insulina. Esta queda da glicose é determinada por dois fatores: supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulinosensíveis. A interpretação do Kitt se baseia na premissa de que quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível o indivíduo é à insulina. O índice corresponde à queda da glicose expressa em %/minuto. Assim, quanto maior o Kitt, maior a sensibilidade à insulina (GELONESE e TAMBASCIA, 2006).

#### 1.6.4 Teores de triglicérides (TG) e colesterol (total, LDL, HDL, VLDL)

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) transportam triglicerídeos (TG) e colesterol (GRUNDY *et al.*, 1999; LOTTENBERG, 2009). As lipoproteínas de

baixa densidade (LDL) transportam colesterol e TG (GRUNDY *et al.*, 1999; LOTTENBERG, 2009). À medida que TG é removido do VLDL pela lipoproteína lipase (LPL), a composição dessa molécula muda tornando-a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) (SCHIAVO *et al.*, 2003) e, parte desta IDL posteriormente se transformará em LDL, também por remoção de TG pela LPL (MARZZOCO e TORRES, 2010; KLOP *et al.*, 2013). A glicose circulante é transformada em glicerol, por meio da via clássica de síntese de TG, a partir da ação da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (MARZZOCO e TORRES, 2010), o qual associado aos ácidos graxos livres leva ao aumento da formação de TG (HIMAYA *et al.*, 1997). O TG estimula a produção de VLDL pelo fígado, a qual é responsável pelo seu carreamento até o tecido adiposo, onde é armazenado (KLOP *et al.*, 2013). Estudos sobre a elevação de TG no soro mostram sua associação com o aumento do risco de doenças coronarianas (SCHIAVO *et al.*, 2003) e há evidências de que a hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para estas doenças (NAKAYA, 2002), por meio de um efeito aterogênico direto das lipoproteínas ricas em TG, particularmente VLDL (LIBBY, 2001). O tamanho das partículas de VLDL liberadas depende da disponibilidade de TG no fígado. As VLDL muito grandes, ricas em TG, são secretadas quando está ocorrendo síntese excessiva de TG hepático, como na obesidade, no DM2 e no excesso de consumo de álcool. Em contrapartida, as pequenas VLDL são secretadas quando a disponibilidade de TG, mas não de colesterol, é diminuída (WYNGAARDEN e SMITH, 1990). Embora a síntese acentuada de TG possa levar a um aumento da eliminação do mesmo, não ocorre o aumento do número de partículas de VLDL liberadas, mas sim a liberação de partículas maiores, contendo mais TG (WYNGAARDEN e SMITH, 1990). A elevação rápida de TG reflete um incremento de VLDL (WYNGAARDEN e SMITH, 1990). É comum encontrar hipertrigliceridemia acompanhada de aumento do colesterol total e do LDL e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) (SCHIAVO *et al.*, 2003; ESTADELLA *et al.*, 2004; CHUFFA e SEIVA, 2013).

#### 1.6.5 Osmolalidade plasmática, proteína plasmática e HbA1c

Osmolalidade é uma unidade de concentração relacionada com a molalidade (NATOCHIN *et al.*, 2012). Ela é baseada não nos moles de soluto, mas nos moles

de partículas por quilograma de solvente, os quais são o fator determinante da osmose. Medidas de osmolalidade, em amostras de plasma e/ou urina, auxiliam no diagnóstico de desordens de fluidos corporais e frequentemente são solicitadas para avaliação de terapia por diálise e administração endovenosa de fluidos (NATOCHIN *et al.*, 2012).

A osmolalidade normal do soro sanguíneo, em humanos, é de 290 mOsm/kg. A hipo-osmolalidade do plasma ou soro sanguíneos indica uma quantidade de água maior que a usual em relação às partículas dissolvidas, indicando problemas como: hiper-hidratação, hiponatremia e estímulo da secreção inapropriada do hormônio antidiurético (NATOCHIN *et al.*, 2012). Já a hiperosmolalidade do plasma ou soro sanguíneos indica uma condição inversa, em que há uma quantidade de água relativamente menor, relacionada a problemas como: desidratação, hiperglicemia, hipernatremia, intoxicações exógenas por etanol, metanol ou polietilenoglicol, e diabetes insipidus (NATOCHIN *et al.*, 2012).

As proteínas plasmáticas têm diversas funções importantes, dentre elas o transporte de moléculas, manutenção da pressão osmótica sanguínea, tamponamento de alterações do pH, nutrição, imunidade humoral, atividade enzimática, coagulação e resposta de fase aguda (Proteínas site, 2014). A albumina é a proteína mais abundante, representando entre 40 a 60% do total de proteínas do plasma (Proteínas site, 2014). A quantificação das proteínas totais é normalmente adotada para diagnosticar problemas nutricionais, doença renal ou hepática (Proteínas site, 2014).

A HbA1c, é também denominada hemoglobina glicosilada ou glicohemoglobina, conhecida, mais recentemente, apenas como A1c (NETTO *et al.*, 2009). O termo "hemoglobina glicada" refere-se a um conjunto de reações entre a hemoglobina A e alguns açúcares. O processo de glicação de proteínas envolve uma ligação não enzimática permanente, principalmente com a glicose (UIRLICH e CERAML, 2001). A HbA1c é um componente menor da hemoglobina, sendo os valores de referência entre 4 a 6%. Níveis acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações como o DM (NETTO *et al.*, 2009; MCQUEEN *et al.*, 2014).

Embora seja utilizada desde 1958 como uma ferramenta de diagnóstico na avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos, a dosagem da HbA1c

passou a ser cada vez mais empregada e aceita pela comunidade científica após 1993, depois de ter sido validada por meio dos dois estudos clínicos mais importantes sobre a avaliação do impacto do controle glicêmico sobre as complicações crônicas do DM: o Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) (1993) e o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) (1998) (NETTO *et al.*, 2009). A dosagem da HbA1c fornece informações acerca do índice retrospectivo da glicose plasmática (BRY *et al.*, 2001). A grande vantagem deste parâmetro está no fato de não sofrer grandes flutuações, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM1 e DM2 (DCCT RESEARCH GROUP, 1993).

#### 1.6.6 O pâncreas e as ilhotas pancreáticas

O pâncreas é um órgão glandular que apresenta uma forma alongada e cônica, situado transversalmente na parte superior da cavidade abdominal (BUSIAH *et al.*, 2014). É possível distinguir três segmentos distintos no pâncreas: a cabeça, que corresponde à porção mais larga, orientada para a direita e adjacente ao duodeno, onde descarrega suas secreções digestivas; o corpo, que corresponde à porção central e mais extensa, a qual cruza a cavidade abdominal até a esquerda, por trás do estômago e à frente da coluna vertebral; e a cauda, que corresponde à porção mais fina e estreita, prolongando-se até a parte esquerda do abdômen, próximo ao baço (BUSIAH *et al.*, 2014). O pâncreas é dividido em duas regiões: o pâncreas exócrino, encarregado da síntese e secreção de enzimas digestivas, e o pâncreas endócrino, responsável pela síntese e secreção de hormônios (JONES *et al.*, 2000). Embriologicamente, as células das ilhotas pancreáticas originam-se ao longo do sistema tubuloductal do pâncreas (JONES *et al.*, 2000). No adulto, a maioria das ilhotas mede de 100 a 200µm e consiste em quatro tipos de células principais: células beta, que são produtoras de insulina; células alfa, que são produtoras de glucagon; células delta, que contêm somatostatina; e células PP, que contêm o polipeptídeo pancreático (JONES *et al.*, 2000). Em estudos com animais experimentais, o tratamento com GLP-1 comprovadamente aumentou a massa de células beta e manteve a função dessas células (ANDREAZZI *et al.*, 2009; SVIDNICKI *et al.*, 2013). Os efeitos do GLP-1 sobre as células beta podem ser

agudos, subagudos ou crônicos (DRUCKER, 2003). De forma aguda, o GLP-1 amplia a secreção de insulina dependente da glicose, ao passo que os efeitos subagudos incluem a estimulação da transcrição da pró-insulina e a biossíntese da insulina (CHACRA, 2006). Os efeitos crônicos são a estimulação da proliferação de células  $\beta$  e neogênese das mesmas a partir das células ductais precursoras, além da maior expressão de transportadores de glicose 2 (GLUT2) e de glicocinase, que regulam a captação da glicose e o metabolismo do pâncreas (CHACRA, 2006). Estudo recente mostrou que a exposição crônica de células alfa a GLP-1 leva ao aumento da síntese desse peptídeo por essas células, evidenciando a atuação direta do GLP-1 em células alfa (PIRO *et al.*, 2014). O aumento no número de células beta acarreta em aumento do número de ilhotas pancreáticas, as quais podem ser isoladas, quantificadas e, por meio da incubação com diferentes concentrações de glicose, podem ser estimuladas a secretar estaticamente, ou seja, incubadas com uma concentração fisiológica de glicose e depois com concentrações maiores ou menores de glicose para estimular a secreção de insulina e/ou glucagon (FLAMEZ *et al.*, 1998).



## **2. JUSTIFICATIVA**

O presente estudo caracteriza os perfis morfométrico e metabólico em modelos animais de DM e de obesidade induzida por excitotoxicidade central e dieta hipercalórica, ampliando o conhecimento sobre a farmacologia e fisiologia de componentes de venenos animais ao abordar os efeitos, nestes modelos, da principal molécula conhecida (exenatida) derivada de veneno animal e com ação endócrina no metabolismo energético, além de contribuir para a descoberta de novos mecanismos relacionados à etiologia e desenvolvimento da obesidade e para a prevenção e tratamento da obesidade e do DM.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Gerais**

Avaliar alterações de parâmetros morfométricos, metabólicos e da capacidade de secreção de insulina e glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas e, principalmente, caracterizar os efeitos da exenatida sobre estas alterações na obesidade hipotalâmica, obesidade dietética e no DM.

#### **3.2. Específicos**

Quanto às alterações e caracterizações supramencionadas:

- ❖ Distinguir os modelos de indução de obesidade hipotalâmica, indução de obesidade por dieta hipercalórica e de indução de DM por STZ, em relação a animais sadios sem tratamento com exenatida;
- ❖ Diferenciar o modelo de indução de obesidade hipotalâmica do modelo induzido por dieta hipercalórica, antes do tratamento com exenatida;
- ❖ Caracterizar cada grupo experimental antes e depois do tratamento com exenatida, comparativamente aos controles sadios sem tratamento com exenatida, evidenciando a efetividade do tratamento para cada modelo;
- ❖ Comparar a efetividade do tratamento com exenatida entre os modelos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais e tratamento

Os animais e protocolos experimentais para uso neste estudo estão em conformidade com a COBEA-BRASIL e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolo 953/12).

#### 4.1.1. Obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG)

Ratas Wistar, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram recebidas entre o 18º e 21º dia de gestação, mantidas em caixas de polipropileno (medidas internas comprimento x largura x altura = 56 x 35 x 19 cm) e acondicionadas, na chegada ao laboratório, em uma estante climatizada, sob condições controladas de temperatura (22º/25ºC) e ciclo de claro e escuro (início do período claro às 6:00 horas). Após 24 horas do nascimento, os filhotes machos passaram a receber, diariamente, entre o horário de 13:00-15:00 horas do período claro, injeção subcutânea (sc), na região cervical, em *bolus*, de 4 mg de MSG/ g MC, num volume máximo de 0,2 mL de salina 0,9%, até completarem 10 dias de idade. Como contrapartidas para controle deste tratamento, foram usados os animais sadios (grupo controle, C-S). Aos 21 dias de idade os filhotes foram desmamados, retirando-se a fêmea lactante das caixas (KAUFHOLD *et al.*, 2002) e mantidos com ração peletizada normocalórica Nuvilab® CR-11 (%/g de ração: 22% proteínas, 55% carboidratos, 4% lipídeos, 9% matéria fibrosa, 10% vitaminas e minerais; total 3kcal/g) e água para beber *ad libitum*. A fêmea retirada foi eutanasiada por decapitação, sob anestesia intraperitoneal [ip] com solução de cloridrato de cetamina (100 mg/mL) e cloridrato de xilazina (100 mg/mL) (0,02 mL/100g MC). Aos 90 dias de idade foram separados os obesos (índice de Lee>0,300). Os animais tratados com MSG eventualmente com índice de Lee<0,300 foram eutanasiados, sob anestesia, seguindo o mesmo procedimento acima descrito. Os obesos foram subdivididos em 2 grupos, quais sejam: (MSG) não recebeu tratamento com exendina-4 durante os 20 dias subsequentes; (MSG-E) recebeu, diariamente, entre

3-4 horas do período claro, injeção sc, na região cervical, de 10 µg de exendina-4 (Sigma)/kg MC em volume máximo de 200 µL de salina 0,9%, em *bolus*, durante os 20 dias subsequentes.

#### 4.1.2 Obesidade dietética (DIO)

Ratos Wistar, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan, com idade entre 72-75 dias, foram mantidos com ração peletizada hiperlipídica (PragSoluções biociências, Brasil) (%/g de ração: 14% proteínas, 42% carboidratos, 32% lipídeos, 5% matéria fibrosa, 7% vitaminas e minerais; total 5,2kcal/g) (DUARTE *et al.*, 2006) e solução de sacarose 30% (30g/100mL, 1,2 kcal/mL) (NASCIMENTO *et al.*, 2008) para beber *ad libitum* e com as demais condições exatamente como citado no item imediatamente anterior. Aos 122-125 dias de idade foram avaliados os efeitos da exenatida nos animais com MC 20% acima do normal para a idade e linhagem (DUARTE *et al.*, 2006). Os que não atingiram este aumento foram eutanasiados por decapitação, sob anestesia, com os mesmos agentes e sob o mesmo esquema e dose já citados. Os obesos foram subdivididos em 2 grupos, quais sejam: (DIO) não recebeu tratamento com exendina-4 durante os 20 dias subsequentes; (DIO-E) recebeu, diariamente, entre 3-4 horas do período claro, injeção sc, na região cervical, de 10 µg/kg MC de exendina-4 em volume máximo de 200 µL de salina 0,9%, em *bolus*, durante os 20 dias subsequentes. Como contrapartida controle deste tratamento também foram usados os animais do grupo C-S mesma idade.

#### 4.1.3 DM induzido por estreptozotocina (STZ)

Ratas Wistar, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan, recebidas entre o 18º e 21º dia de gestação, mantidas em caixas de polipropileno (medidas internas comprimento x largura x altura = 56 x 35 x 19 cm) e acondicionadas, na chegada ao laboratório, em uma estante climatizada, sob condições controladas de temperatura (22º/25ºC) e ciclo de claro e escuro (início do período claro às 6:00 horas). Após 24 horas do nascimento, os filhotes machos receberam injeção única, em *bolus*, de STZ dissolvida em 0,05M tampão citrato, pH 4,5 (ip), na dose de 70

mg/kg MC, em volume máximo de 0,2 mL (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). Aos 21 dias de idade os filhotes foram desmamados, retirando-se a fêmea lactante das caixas (KAUFHOLD *et al.*, 2002) e mantendo-se ração peletizada normocalórica supracitada e água para beber *ad libitum*. A fêmea retirada foi eutanasiada por decapitação, sob anestesia, com os mesmos agentes e sob o mesmo esquema e dose já citados. Regime similar, mas com dose de STZ de 50 mg/kg MC, foi adotado previamente por Strauss *et al.* (2008) e Zambotti-Villela *et al.* (2007a, 2007b, 2008). Aos 60 dias de idade foram selecionados os animais com DM, pela hiperglicemia >150 mg/dL, mensurada na segunda gota de sangue, obtida, sem pressionar, de discreto corte na ponta da cauda, no aparato Accu-Chek Advantage (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A). Os animais tratados com STZ, mas normoglicêmicos, foram eutanasiados por decapitação, sob anestesia, com os mesmos agentes e sob o mesmo esquema e dose já citados. Os animais diabéticos foram subdivididos em 2 grupos, quais sejam: (STZ) não recebeu tratamento com exenatida durante os 20 dias subsequentes; (STZ-E) recebeu, diariamente, entre 3-4 horas do período claro, injeção sc, na região cervical, de 10 µg/kg MC de exendina-4 em volume máximo de 200 µL de salina 0,9%, em *bolus*, durante os 20 dias subsequentes. Como contrapartida controle deste tratamento também foram usados os animais do grupo C-S da mesma idade. Estudos anteriores mostraram que doses de exendina-4, variando entre 3 e 10 µg/kg MC, administradas em dose única ou durante 7 dias foram capazes de reduzir a glicemia e proteger animais diabéticos de danos neuronais (MURTHY *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; HAYES *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012).

## **4.2 Ingestão de alimento e líquido**

A ingestão de alimento e água foi monitorada desde 22-25 dias até 140-145 dias de idade, respectivamente pelas medidas de peso e volume dos conteúdos inicial e restante nos respectivos recipientes de comida e bebida, a cada 48 horas, sendo os valores obtidos extrapolados para uma semana.

## **4.3 MC, CNA, índice de Lee e adiposidade**

Foram mensurados MC (g), CNA (cm), bem como retirados os depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal, conforme segue: o abdômen foi submetido à antissepsia com etanol 70% e, em seguida, a cavidade abdominal foi aberta com tesoura e os depósitos retirados com pinça para, então, serem medidas suas massas relativas (adiposidade). O índice de Lee foi calculado pela equação  $(MC [em g])^{0,33} / CNA[em cm]$ .

#### **4.4 OGTT e ITT**

Para a realização do OGTT os animais foram colocados em jejum por 15 horas e, ao término, foi mensurada na segunda gota de sangue, obtida, sem pressionar, de discreto corte na ponta da cauda, no aparato Accu-Chek Advantage (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A), a glicemia no tempo 0 (basal). Logo após, foi administrado, por via oral (gavagem), solução de glicose (2 g/mL de água, num volume máximo de 1 mL) (2g de glicose/kg MC), e o sangue foi coletado da cauda nos tempos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. A AUC da glicemia em função do tempo foi calculada (AMARAL *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012).

Para o ITT os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e, ao término, foi mensurada, na segunda gota de sangue, obtida, sem pressionar, de discreto corte na ponta da cauda, no aparato Accu-Chek Advantage (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A), a glicemia no tempo 0 (basal). Logo após, foi administrado, por via ip, solução de insulina (1 UI de insulina /mL de salina, num volume máximo de 0,750 mL) (0,75 UI insulina/kg MC). Os valores da glicemia foram convertidos em logaritmo natural (Ln), a inclinação foi calculada por meio da regressão linear [tempo $\times$ Ln(glicose)] e multiplicada por 100 para se obter o Kitt (durante o ITT) por minuto (LEHNEN *et al.*, 2010). Em ambos os testes os animais encontravam-se conscientes e não sob efeito de anestésicos.

#### **4.5 Obtenção do plasma e teores de TG, colesterol (total, LDL, HDL, VLDL)**

Após anestesia com os mesmos agentes e sob o mesmo esquema e dose já citados, os animais, ao término de cada experimento, foram submetidos à retirada

de amostras individuais de sangue, por punção do ventrículo esquerdo, utilizando seringa heparinizada.

O plasma foi obtido por centrifugação do sangue a 1500 rpm, 22°C por 10 minutos (microcentrífuga H-240 Hsiangtai Machinery Ind. Co. Ltd, Taiwan) e congelado a -80°C, por um período máximo de 10 dias, até sua utilização. Os teores plasmáticos de TG e colesterol (total, LDL, HDL, VLDL) foram medidos, colorimetricamente, em triplicatas de amostras de 3-40 µL, com os kits específicos correspondentes (Laborlab, Brasil).

#### **4.6 Osmolalidade plasmática, proteína plasmática e HbA1c**

A osmolalidade plasmática foi determinada em triplicatas de 10 µL de plasma individual com um osmômetro crioscópico (Osmette II Fisher).

O teor de proteína plasmática (diluído 500 vezes) foi medido fotometricamente (Bio-Tek Power Wave espectrofotômetro XR), a 630 nm, em triplicatas de 40µL de amostras pelo método de Bradford (1976), usando reagente Bio-Rad (Hercules, EUA). O teor de proteína foi interpolado por comparação com uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma) no mesmo diluente.

O teor de HbA1c foi medido em triplicatas de amostras de 100 µL de sangue total, imediatamente após a coleta, por ensaio enzimático colorimétrico com o kit Glicohemoglobina Monoteste (Inlab, Brasil).

#### **4.7 Isolamento das ilhotas pancreáticas**

Animais devidamente anestesiados, com os mesmos agentes e sob o mesmo esquema e dose já citados, foram decapitados e tiveram o abdômen submetido à antissepsia com etanol 70%. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta com tesoura, o ducto biliar comum foi localizado e a ramificação no sentido fígado-duodeno foi clampeada na porção adjacente ao duodeno. Então, o pâncreas foi divulsionado pela infusão de 15 mL de solução de Hanks + 5,6Mm de glicose, contendo 0,7 mg colagenase tipo V /mL. A seguir, o pâncreas foi removido com uma tesoura, cortado em pedaços grandes e transferido para um tubo de ensaio (de 25 mL) com 5 mL de solução de Hanks, contendo 0,7 mg/mL de colagenase tipo V, e

incubado em banho-maria a 37°C, por 25 minutos; o tubo foi agitado levemente, duas ou três vezes, durante o tempo de incubação. Para interromper a atividade da colagenase, as amostras foram colocadas em gelo, foi adicionado 0,1% de albumina em 35 mL de Hanks para cada tubo de centrifugação com amostra, sendo este agitado (entre 10 a 15 vezes). A seguir o material foi lavado 4 vezes a cada 6 minutos pela remoção de 10 mL do conteúdo do tubo de centrifugação e subsequente adição de 10 mL de solução de Hanks sem colagenase, a 4°C. As amostras foram vertidas em placas de Petri de vidro e as ilhotas foram coletadas, uma a uma, com o auxílio de um microcapilar e lupa para posterior incubação, como descrito no item 4.8 (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967; PERES e CURI, 2005).

#### **4.8 Incubação de ilhotas isoladas**

As ilhotas isoladas foram coradas com ditizona e divididas em dois grupos: um para avaliar a secreção de insulina e outro para avaliar a secreção de glucagon. Em triplicatas, cinco ilhotas foram acondicionadas em microtubos e pré-incubadas em 500 µL de solução de Krebs-bicarbonato+5,6mM de glicose (concentração fisiológica), por 30 min, a 37°C, em estufa seca, sob leve agitação em agitador orbital. Ao término da pré-incubação, foi realizado um rápido *spin* para depósito das ilhotas no fundo do microtubo, retirados 460 µL do sobrenadante e acrescentados 500 µL da solução de estímulo, qual seja, Krebs-bicarbonato + 20mM glicose para secreção de insulina e Krebs-bicarbonato + 1mM glicose para secreção de glucagon. As ilhotas foram estimuladas por 1 hora, a 37°C, em estufa seca, sob leve agitação, em agitador orbital. Após a incubação, foi retirado 300 µL do sobrenadante, o qual foi transferido para um microtubo devidamente identificado e armazenado a -80°C para os testes posteriores (DUARTE *et al.*, 2006; SVIDNICKI *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2011).

#### **4.9 Teores de insulina e glucagon**

O teor de glucagon no sobrenadante resultante da incubação das ilhotas foi avaliado por luminescência (Synergy H1, BioTek, EUA) a 460/20 nm, em duplicata, utilizando o kit de ELISA Glucagon Chemiluminescent (EZGLU-30K; Merck,



Alemanha), tendo como padrão o glucagon (que acompanha o kit) dissolvido em tampão de reação.

O teor de insulina foi avaliado, espectrofotometricamente (Synergy H1, BioTek, EUA), no sobrenadante resultante da incubação das ilhotas e no plasma, a 450 e 560 nm, em duplicata, utilizando o kit de ELISA Rat/Mouse Insulin (EZRMI-13K; Merck), tendo como padrão a insulina que acompanha o kit.

#### **4.10 Análise e apresentação dos dados**

Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism 5 e apresentados como média $\pm$ SEM. A análise de variância ANOVA, seguida do teste pos hoc Newman-Keuls foi usada para comparação entre mais de dois grupos. O teste t de Student foi utilizado para comparação entre dois grupos experimentais. O nível crítico mínimo adotado foi de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

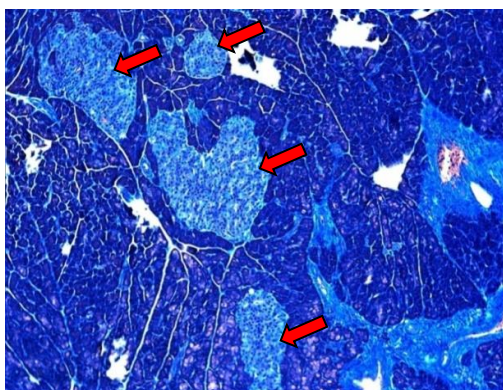
### 5.1 Mortalidade, exclusão e efetividade dos tratamentos

A Tabela 1 mostra a porcentagem de mortalidade, exclusão e efetividade da indução dos modelos DIO, MSG e STZ. Entenda-se a exclusão para o grupo DIO como a porcentagem de animais que não obtiveram MC 20% maior que a média dos controles; para o grupo MSG, a exclusão é a porcentagem de animais que não atingiram índice de Lee maior que 0,3; e, para o grupo STZ, a exclusão é a porcentagem de animais com glicemia abaixo de 150 mg/dL. As taxas de efetividade referem-se aos animais sobreviventes não excluídos.

**Tabela 1.** Porcentagem de mortalidade, exclusão e efetividade durante o período experimental.

Grupos Experimentais	Número Amostral	Exclusão (%)	Mortalidade (%)	Efetividade (%)
DIO	31	35,5	0	64,5
MSG	60	0	65	35
STZ	133	63	24	13

A Figura 3 mostra ilhotas pancreáticas de ratos saudáveis.



**Figura 3.** Fotomicrografia de ilhotas pancreáticas do rato, em corte histológico transversal, coradas com tricômio de Gomori (indicadas por setas vermelhas). Aumento de 200x.

A Figura 4 mostra uma ilhota pancreática isolada de rato saudável, segundo a metodologia adotada.



**Figura 4.** Aspecto de ilhota pancreática isolada de rato. Aumento de 100x.

## 5.2 DIO

Não houve diferença estatística na MC absoluta (g) e no CNA (cm) no início do experimento (1ª semana) entre C-S e DIO (Tabela 2).

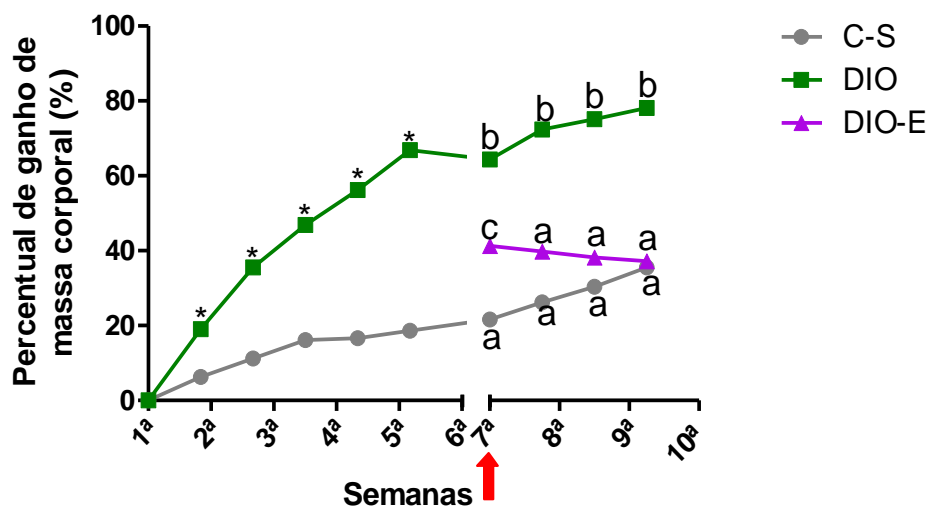
**Tabela 2.** MC absoluta e CNA dos grupos C-S de DIO no início do experimento (1ª semana).

	N	MC (g)	CNA (cm)
		1ª semana	1ª semana
<b>C-S</b>	10	343,6 ± 12,20	21,7 ± 0,32
<b>DIO</b>	20	321,9 ± 10,24	21,6 ± 0,42

Valores são média±SEM. Teste t Student não pareado, bicaudal, DIO x C-S ( $p>0,05$ ).

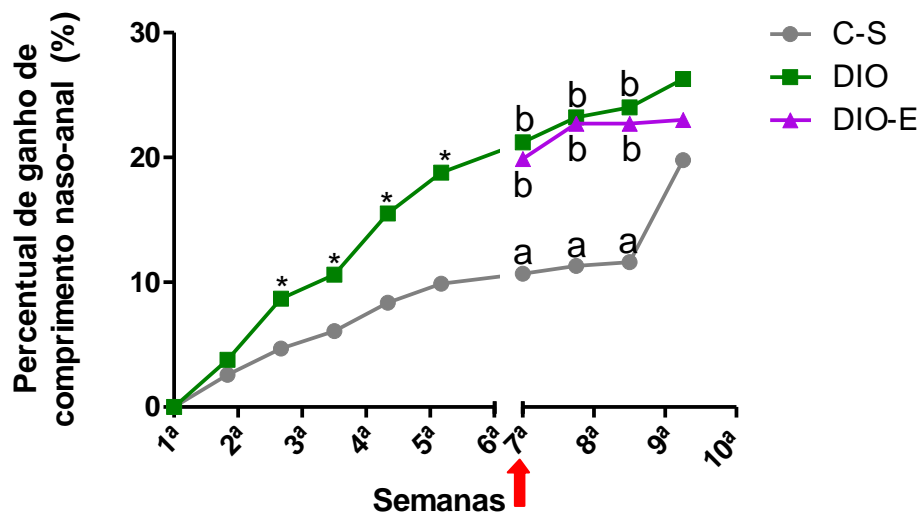
As Figuras 5 a 24 mostram os dados morfométricos e metabólicos dos grupos DIO, DIO-E e C-S, obtidos a partir da idade de 75 dias até completarem 4 meses e 20 dias. A MC e o CNA são dados em porcentagem relativa aos valores iniciais (1ª semana) do mesmo animal.

A Figura 5 mostra que da 2ª a 6ª semana o ganho de MC do grupo DIO foi maior em relação ao C-S. DIO-E, a partir da 7ª semana, apresentou menor ganho de MC em relação ao DIO, mantendo-se igual à C-S, a partir da 8ª semana até o final do experimento (final do período de avaliação ou indução). Ao final do experimento (10ª semana), o ganho da MC de C-S, DIO e DIO-E, em relação ao início do experimento, foi: 35,5% em C-S, 78,1% em DIO e 37,2% em DIO-E.



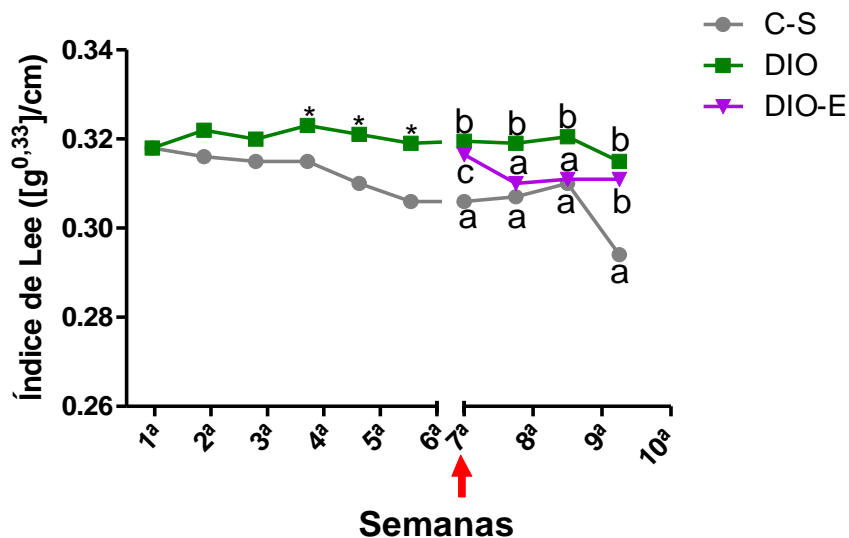
**Figura 5.** Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9) em relação ao primeiro dia de indução. Valores são média  $\pm$  SEM. 1ª semana = porcentagem inicial (ganho = 0). A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 6ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S na mesma semana); a partir da 7ª semana, ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

A Figura 6 mostra que o ganho do CNA de DIO foi maior a partir da 3ª semana, em relação a C-S. A partir da 7ª semana, o ganho do CNA de DIO manteve-se maior em relação a C-S e igual a DIO-E até o final do experimento. No entanto, na última semana não houve diferença significativa entre os grupos. Ao final do experimento (10ª semana), o ganho do CNA dos grupos, em relação ao início do experimento, foi: 19,8% em C-S, 26,3% em DIO e 22% em DIO-E.



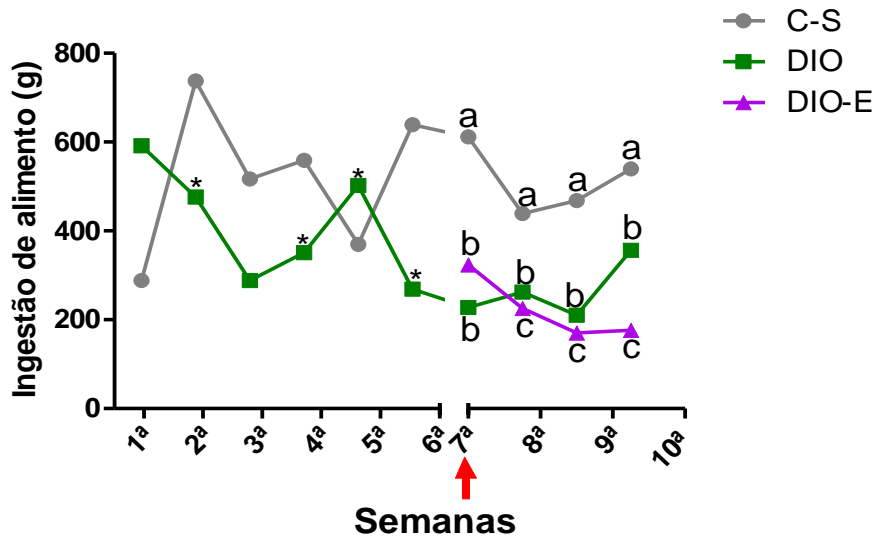
**Figura 6.** Percentual de aumento de CNA dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9) em relação ao primeiro dia de indução. Valores são média  $\pm$  SEM. 1ª semana = porcentagem inicial (ganho = 0). A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 6ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S na mesma semana); a partir da 7ª semana, ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

Na Figura 7, observa-se que o índice de Lee foi maior em DIO a partir da 4ª semana em relação a C-S, permanecendo maior entre a 8ª e 9ª semana nos animais DIO, em relação a C-S e DIO-E.



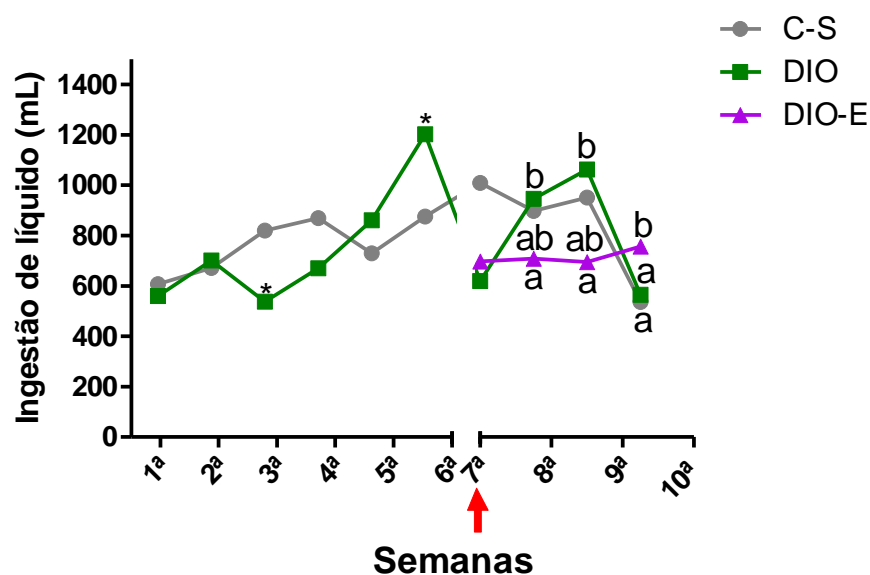
**Figura 7.** Índice de Lee dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 6ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 7ª semana, ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

Como mostra a Figura 8, o grupo DIO diminuiu a ingestão de alimento na 2ª, 4ª e 6ª semana, e aumentou na 5ª semana, em relação a C-S. Na 7ª semana a ingestão de alimento de DIO e DIO-E diminuiu em relação a C-S. A partir da 8ª semana, a ingestão de alimento de DIO-E diminuiu em relação a DIO e C-S.



**Figura 8.** Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 6ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 7ª semana, ANOVA (p<0.05) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos na mesma semana).

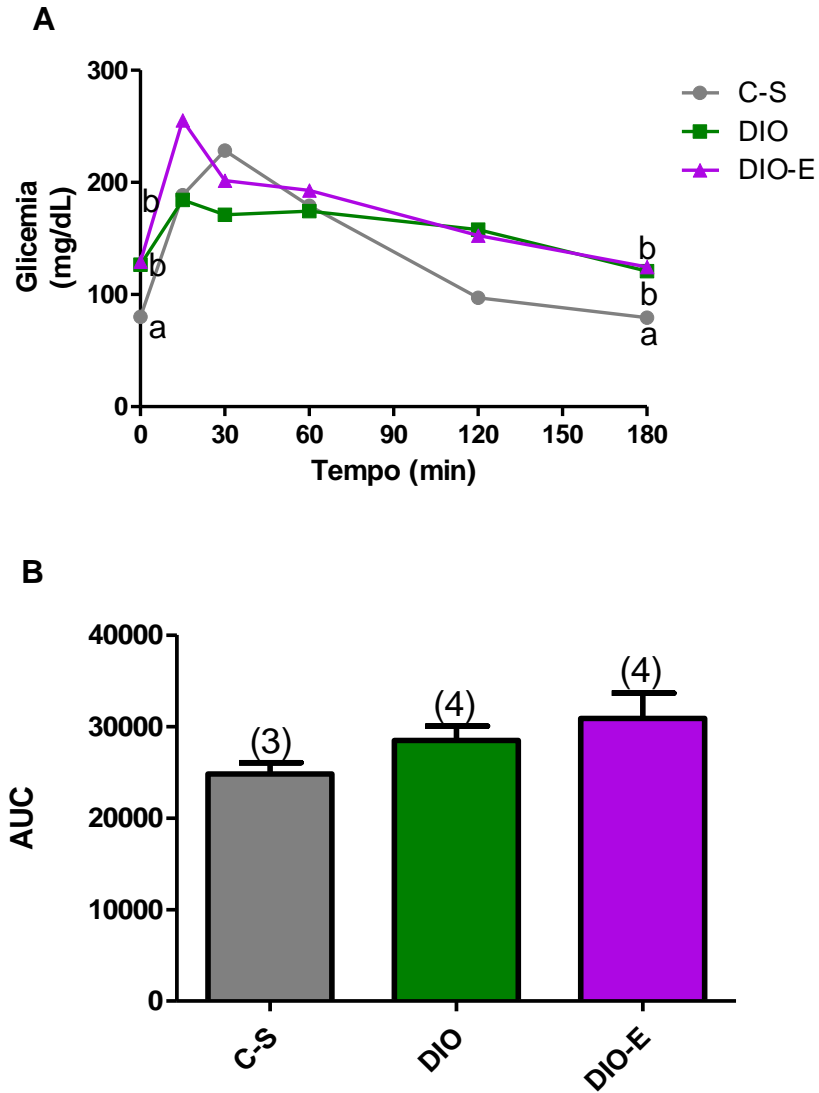
A ingestão de líquido (sacarose 30% para DIO e DIO-E; e água para C-S) (Figura 9) do DIO foi menor na 3ª semana e maior na 6ª semana em comparação ao C-S. Na 8ª e 9ª semanas, o consumo de DIO foi maior quando comparado com DIO-E. No entanto, no final do experimento o consumo do DIO-E foi maior, em relação a C-S e DIO.



**Figura 9.** Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=10), DIO (n=11), DIO-E (n=9). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 6ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 7ª semana, ANOVA (p<0.05) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos na mesma semana).

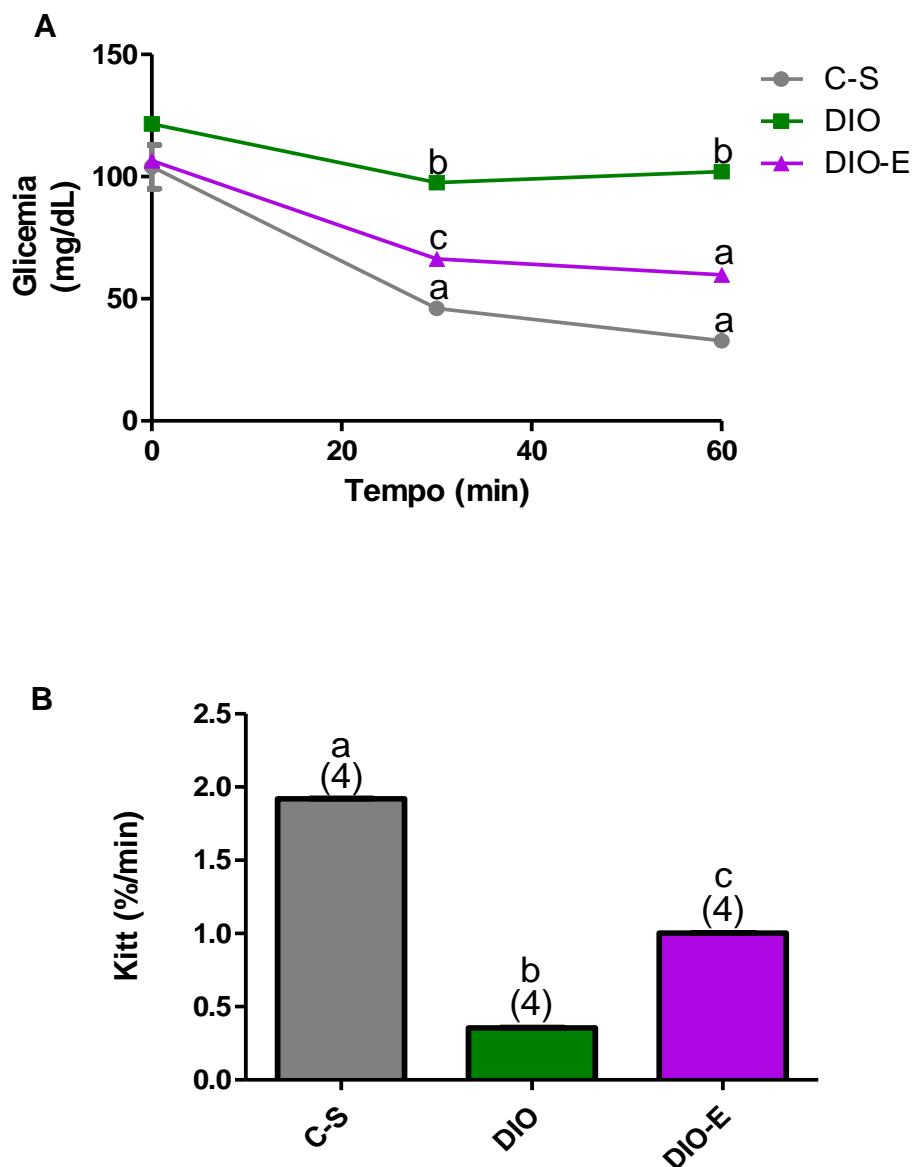


Observa-se, na Figura 10A, que os animais DIO e DIO-E iniciaram (tempo 0) e terminaram (tempo 180) o OGTT com glicemia superior a C-S. Não houve diferença entre os grupos na análise da AUC(C-S: 24823±1214; DIO: 28489±1571; DIO-E: 30891±2751) (Figura 10B).



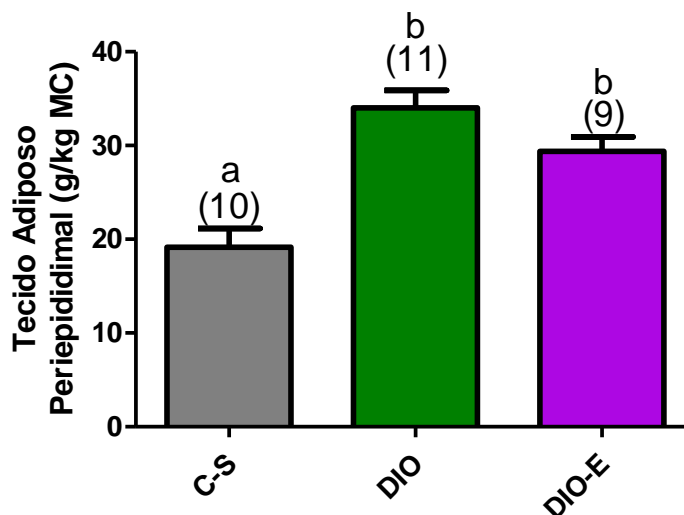
**Figura 10.** Glicemia de jejum (A) e AUC (B) do Teste de Tolerância Oral à Glicose dos animais controles saudios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Os animais DIO apresentaram maior glicemia durante o experimento de ITT, em relação a C-S e DIO-E (Figura 11A). O Kitt foi maior em DIO-E (1,003±0,001) em relação a DIO (0,355±0,002), porém ainda foi menor que em C-S (1,919±0,001) (Figura 11B).



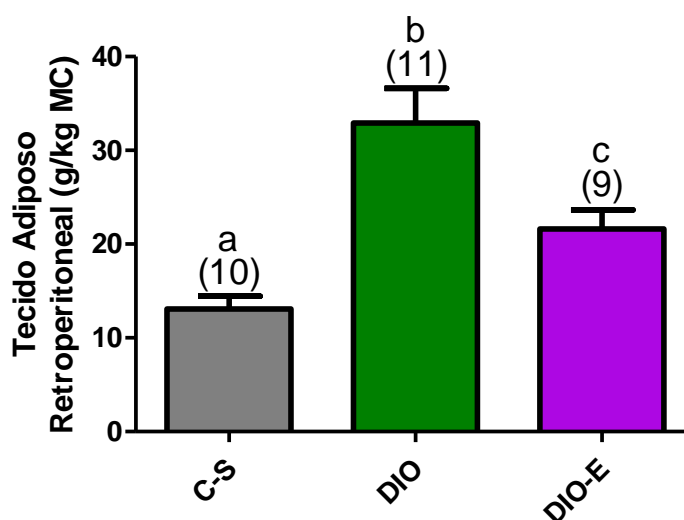
**Figura 11.** Glicemia de jejum (A) e Kitt (B) do Teste de Tolerância à Insulina dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Na Figura 12 observa-se que a massa relativa do tecido adiposo periepidual foi maior em DIO ( $34,02 \pm 1,86$ ) e DIO-E ( $29,4 \pm 1,53$ ) em relação a C-S ( $19,16 \pm 1,99$ ).



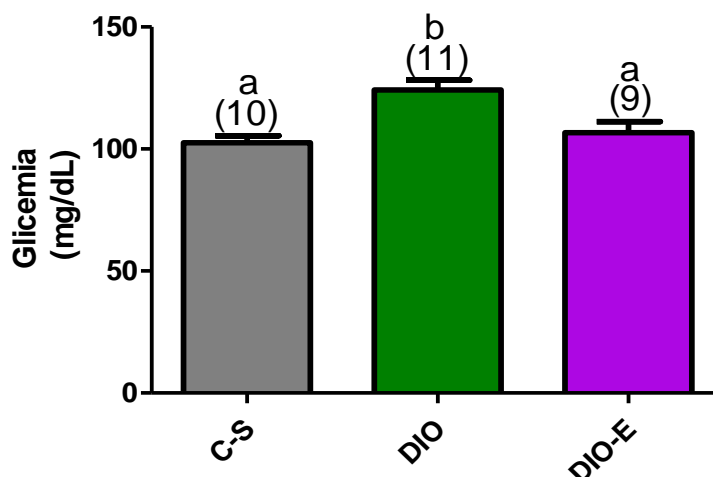
**Figura 12.** Massa do tecido adiposo periepidual dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

A massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 13) foi maior no DIO ( $32,9 \pm 3,72$ ) em relação aos grupos DIO-E ( $21,60 \pm 2,06$ ) e C-S ( $13,08 \pm 1,38$ ), sendo DIO-E maior que C-S.

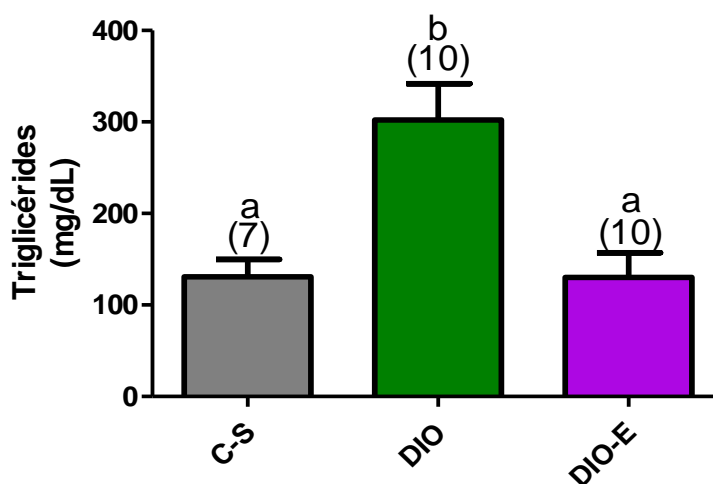


**Figura 13.** Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

A Figura 14 mostra que a glicemia de DIO ( $124 \pm 4,02$ ) foi maior, em relação a C-S ( $103 \pm 2,88$ ) e DIO-E ( $107 \pm 4,50$ ). Os níveis de TG (Figura 15) foram maiores no DIO ( $302,19 \pm 39,71$ ), em relação a C-S ( $130,89 \pm 18,86$ ) e DIO-E ( $130,10 \pm 27,00$ ).



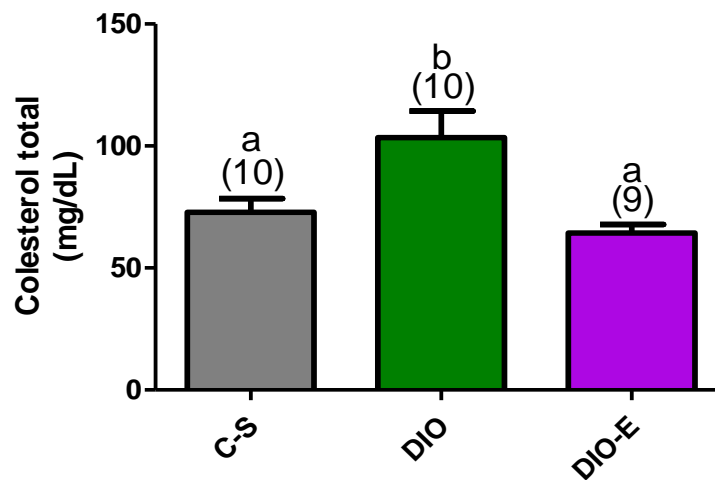
**Figura 14.** Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



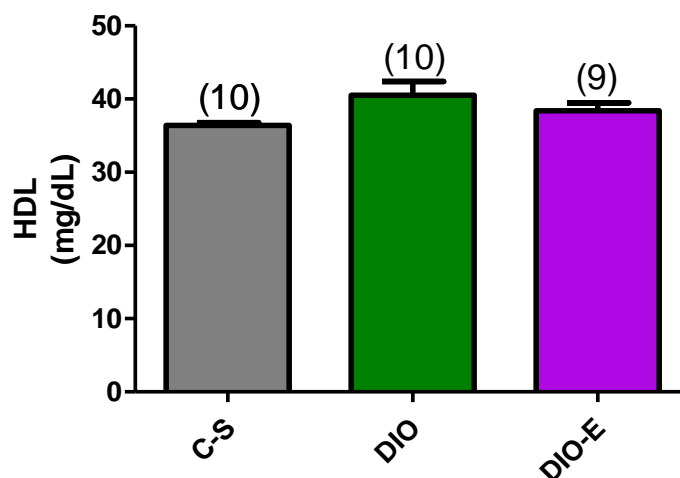
**Figura 15.** TG dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Os níveis de colesterol total (Figura 16) foram maiores no DIO ( $103,45 \pm 10,85$ ), em relação aos grupos DIO-E ( $64,30 \pm 3,51$ ) e C-S ( $72,85 \pm 5,56$ ). Não

houve diferença nos níveis de HDL colesterol entre C-S, DIO e DIO-E (C-S: 36,41±0,37; DIO: 40,54±1,85; DIO-E: 38,40±1,06) (Figura 17).



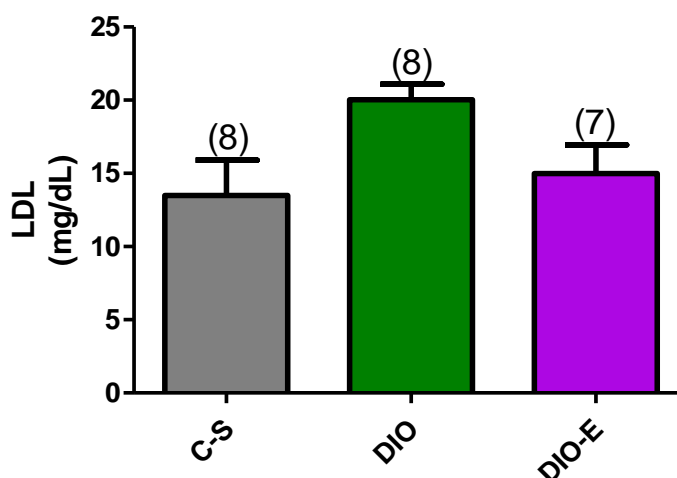
**Figura 16.** Colesterol total dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



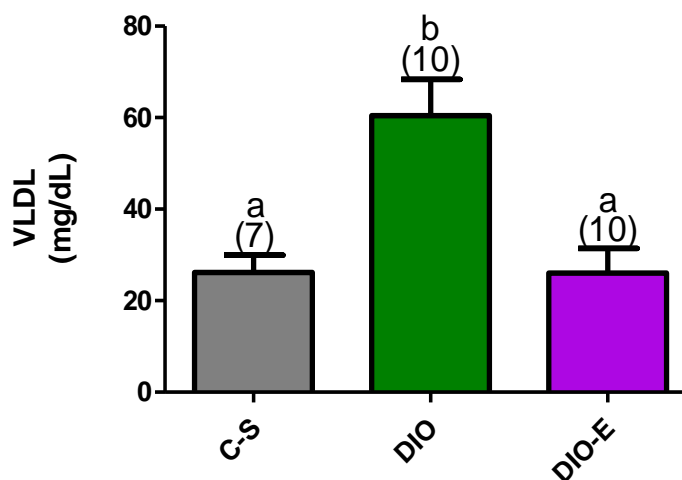
**Figura 17.** HDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E.

Não houve diferença nos níveis de LDL colesterol entre C-S, DIO e DIO-E (C-S: 13,49±2,42; DIO: 20,04±1,06; DIO-E: 14,99±1,97) (Figura 18). Os níveis de VLDL

colesterol (Figura 19) foram maiores no DIO ( $60,44 \pm 7,94$ ), em relação a C-S ( $26,18 \pm 3,77$ ) e DIO-E ( $26,02 \pm 5,40$ ).



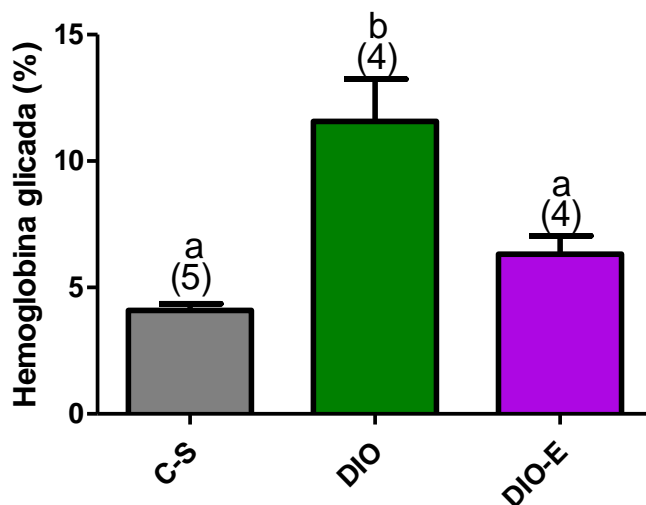
**Figura 18.** LDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E.



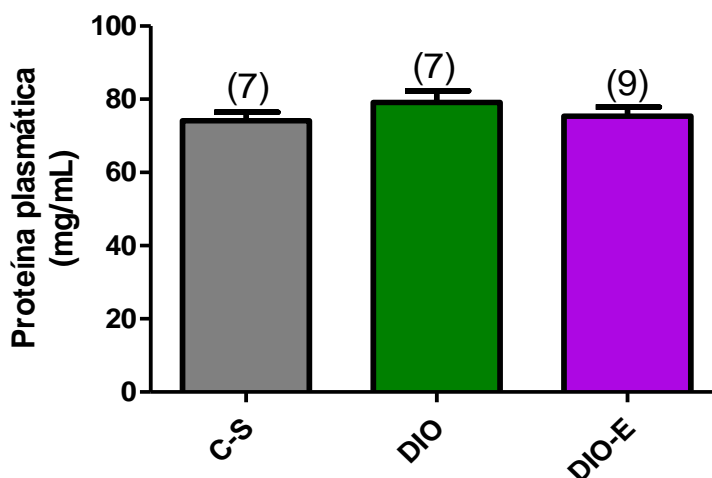
**Figura 19.** VLDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

A HbA1c foi maior nos animais DIO ( $11,57 \pm 1,68$ ) em relação a C-S ( $4,09 \pm 0,27$ ) e DIO-E ( $6,32 \pm 0,73$ ) (Figura 20). Não houve diferença no teor de

proteínas plasmáticas entre C-S, DIO e DIO-E (C-S:  $74,16 \pm 2,26$ ; DIO:  $79,13 \pm 3,18$ ; DIO-E:  $75,40 \pm 2,46$ ) (Figura 21).



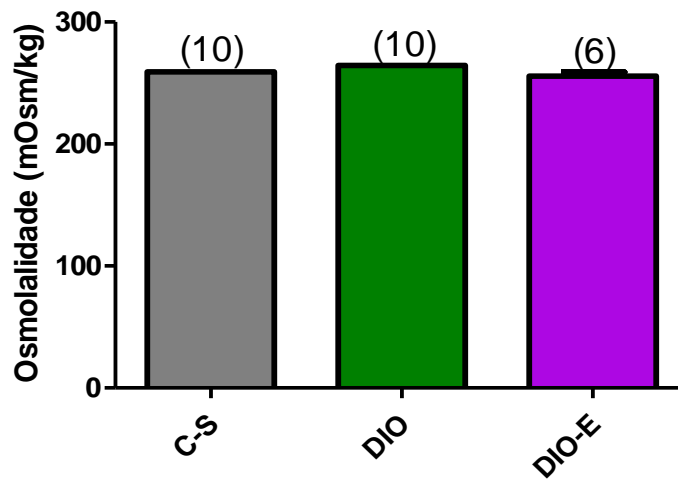
**Figura 20.** HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



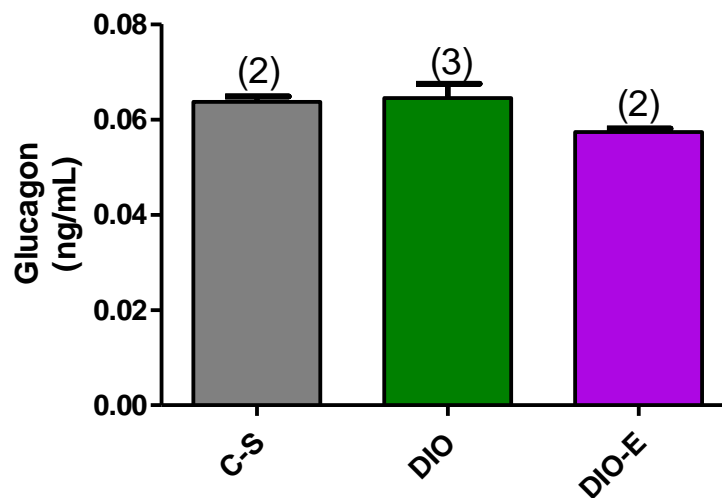
**Figura 21.** Proteína plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x DIO x DIO-E.

Não houve diferença na osmolalidade plasmática (C-S:  $259,05 \pm 3,39$ ; DIO:  $264,40 \pm 3,10$ ; DIO-E:  $255,67 \pm 3,21$ ) (Figura 22) e no teor de glucagon (C-S:  $0,064 \pm 0,001$ ; DIO:  $0,065 \pm 0,003$ ; DIO-E:  $0,057 \pm 0,001$ ) (Figura 23) e insulina (C-S:

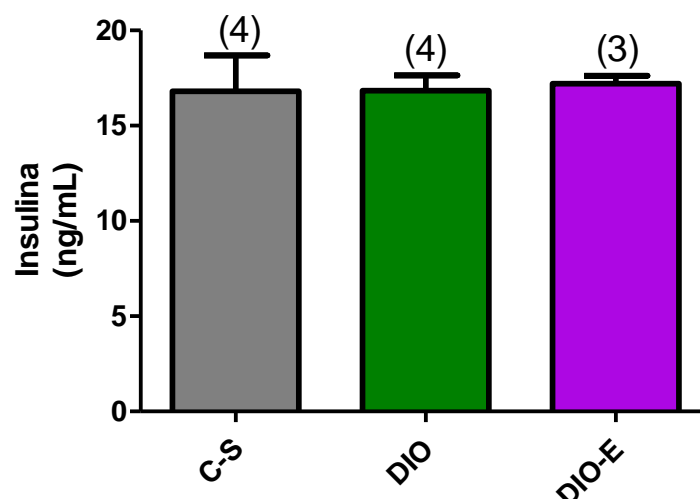
16,811±1,885; DIO: 16,839±0,808; DIO-E: 17,205±0,726) (Figura 24) secretado por ilhotas pancreáticas isoladas entre C-S, DIO e DIO-E.



**Figura 22.** Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E.



**Figura 23.** Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E.





**Figura 24.** Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles saudáveis (C-S), com obesidade induzida por dieta sem (DIO) e com tratamento com exenatida (DIO-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x DIO x DIO-E.

### 5.3 MSG

Não houve diferença estatística na MC absoluta (g) entre C-S e MSG, porém o CNA (cm) na primeira semana após o desmame (4ª semana) foi maior em C-S, em relação à MSG (Tabela 3).

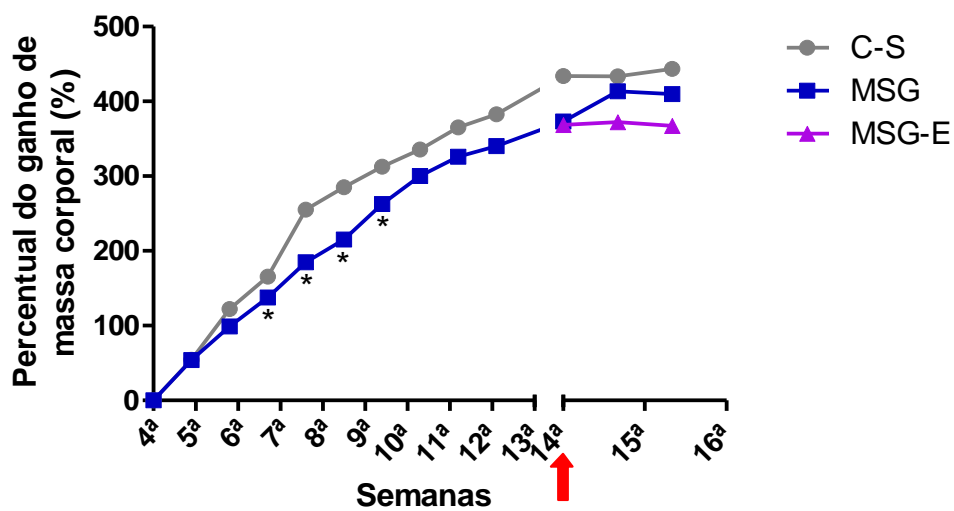
**Tabela 3.** MC absoluta e CNA dos grupos C-S e MSG na primeira semana após o desmame (4ª semana).

	N	MC (g)	CNA (cm)
		4ª semana	4ª semana
<b>C-S</b>	11	74,5 ± 5,52	15,2 ± 1,42
<b>MSG</b>	21	72,5 ± 1,56	12,8 ± 0,20*

Valores são média±SEM. Teste t Student não pareado, bicaudal MSG x C-S (\* $p<0,05$ ).

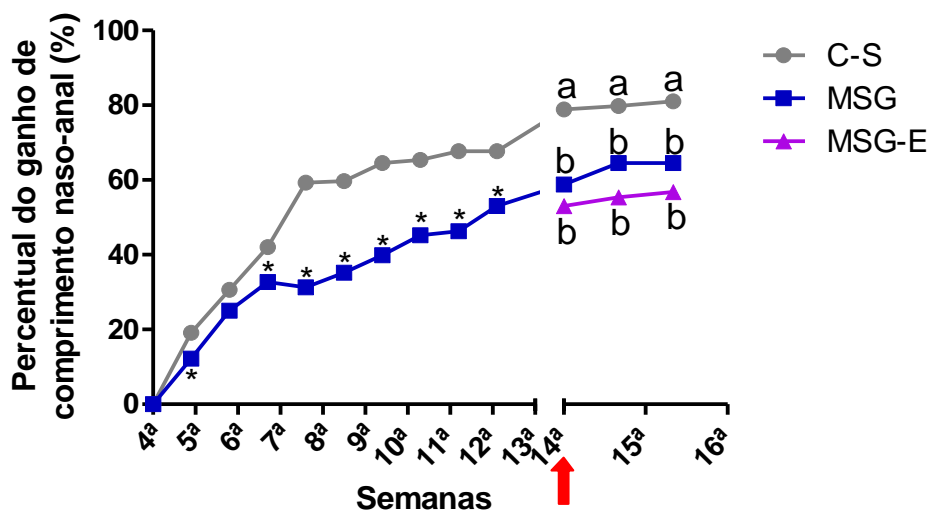
As Figuras 25 a 44 mostram os dados morfométricos e metabólicos dos grupos MSG, MSG-E e C-S, obtidos a partir do desmame (21 dias de idade) até completarem 3 meses e 20 dias. A MC e o CNA são apresentados em porcentagem relativa à MC e CNA inicial (1ª semana após o desmame) do mesmo animal.

A Figura 25 mostra que o ganho de MC foi menor em MSG, em relação a C-S, na entre a 7ª e 10ª semana. A MC dos grupos MSG e MSG-E não sofreu alteração em relação a C-S durante o período de tratamento com exenatida (da 14ª a 16ª semana). Ao final do experimento, o ganho de MC em cada grupo, em relação ao início dos experimentos, foi: 443,6% em C-S, 409,9% em MSG e 363,4% em MSG-E.



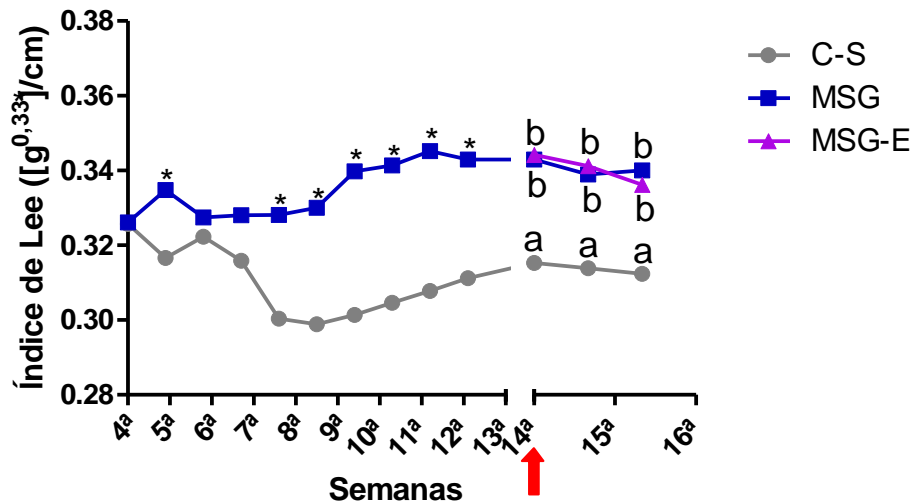
**Figura 25.** Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 13ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S na mesma semana); a partir da 14ª semana, ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E.

O ganho de CNA (Figura 26) de MSG foi menor na 5ª semana e da 7ª até a 13ª semana, em relação à C-S. Após a 14ª semana (início do tratamento com exenatida), MSG e MSG-E tiveram menor ganho de CNA que C-S. Ao final do experimento, o ganho de CNA em cada grupo, em relação ao início dos experimentos, foi: 81 % em C-S, 64,5 % em MSG e 56,8% em MSG-E.



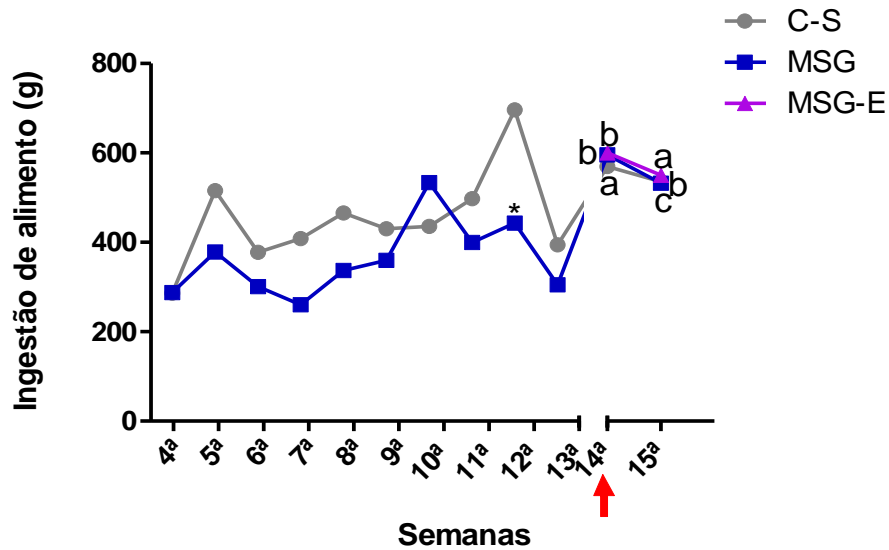
**Figura 26.** Percentual de ganho de CNA dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 13ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S na mesma semana); a partir da 14ª semana, ANOVA (p>0.05) C-S x MSG x MSG-E.

O índice de Lee (Figura 27) na 5ª e entre a 8ª até a 13ª semana permaneceu maior em MSG, em relação ao C-S. A partir da 14ª semana, o índice de Lee de MSG-E e MSG foi maior quando comparado ao grupo C-S.



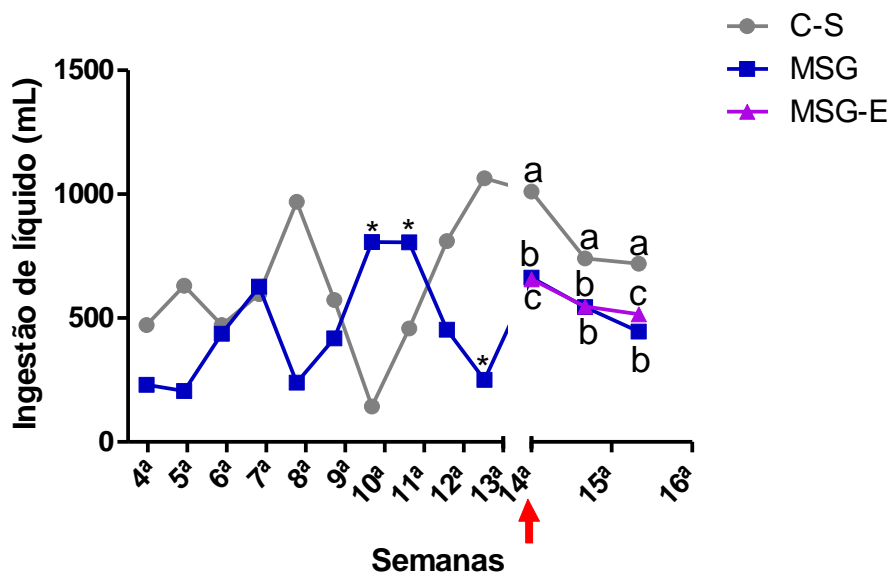
**Figura 27.** Índice de Lee dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtido a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 13ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S na mesma semana); a partir da 14ª semana, ANOVA (p<0,05) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

A ingestão de alimento (Figura 28) foi menor em MSG na 12ª semana, em relação a C-S. Na 14ª semana, o MSG e MSG-E consumiram maior quantidade de alimento que C-S, porém na 15ª semana o consumo de MSG-E foi maior em relação à MSG e C-S.



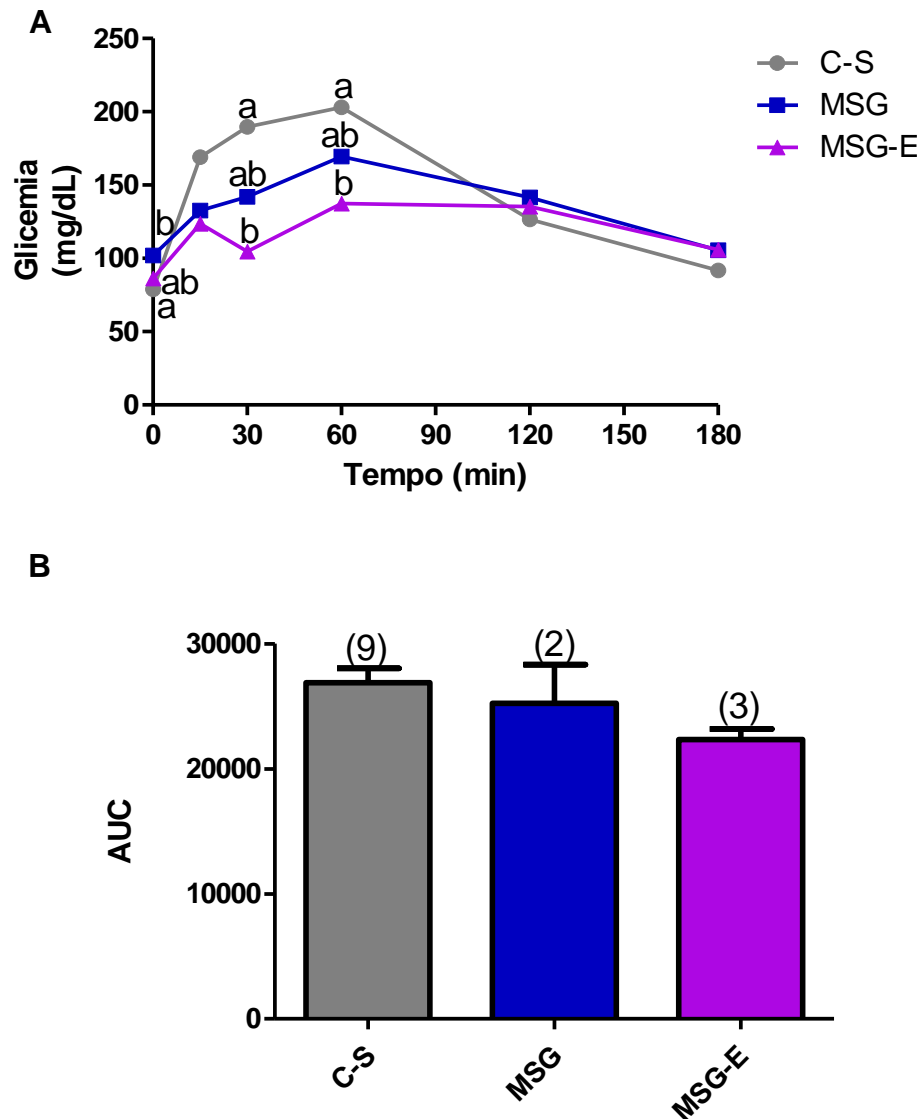
**Figura 28.** Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtida a partir da segunda semana após o desmame (5ª semana de vida). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 13ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S na mesma semana); a partir da 14ª semana, ANOVA (p<0,05) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

A ingestão de líquido foi maior em MSG na 10<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> semana e menor na 13<sup>a</sup> semana em relação a C-S (Figura 29). Na 14<sup>a</sup> semana, a ingestão de líquido de MSG-E foi menor, em relação a C-S e MSG, o qual também apresentou menor consumo de líquido que C-S. Na 15<sup>a</sup> semana, o consumo de líquido de MSG e MSG-E diminuiu em relação a C-S. Na 16<sup>a</sup> semana, MSG ingeriu menos líquido que C-S e MSG-E, o qual também teve menor consumo que C-S.



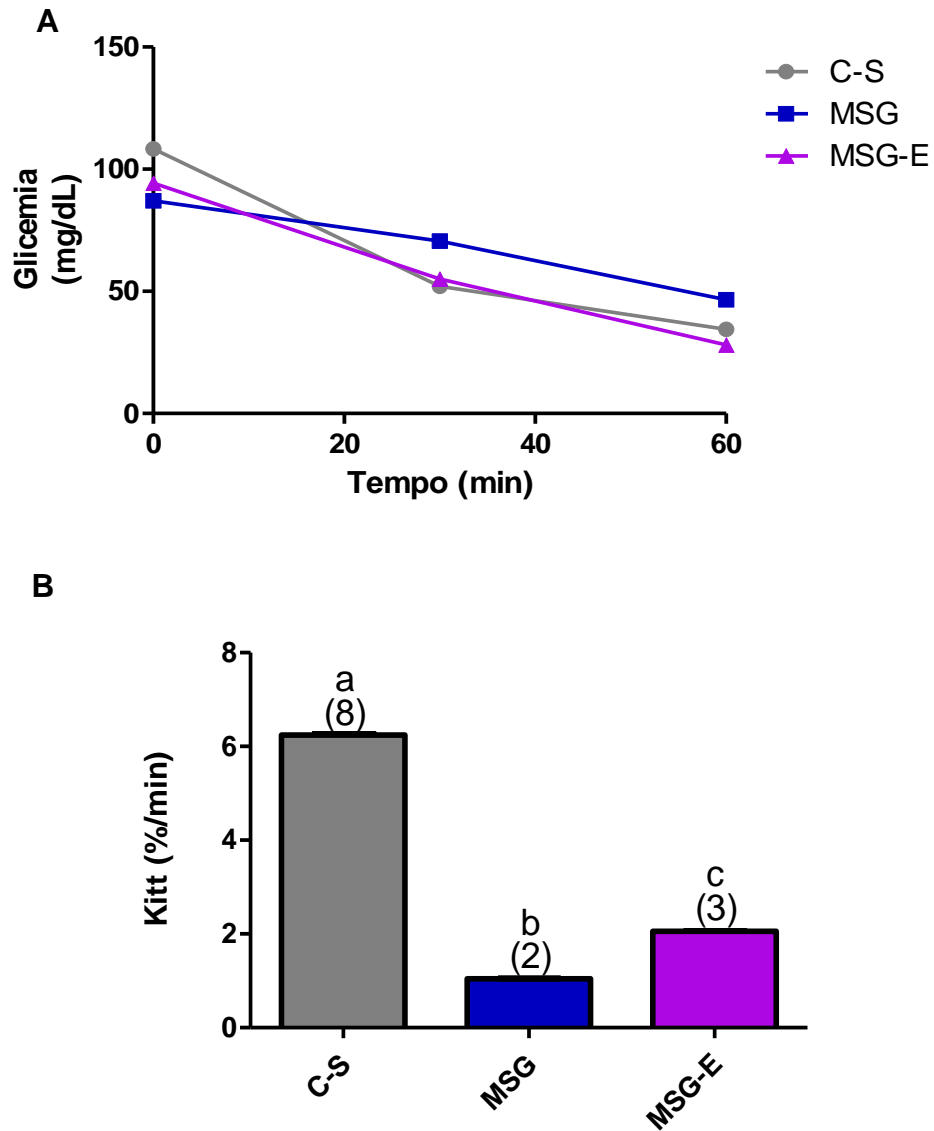
**Figura 29.** Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=11), MSG (n=10) e MSG-E (n=11) obtida a partir da segunda semana após o desmame (5<sup>a</sup> semana de vida). Valores são média±SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 13<sup>a</sup> semana (\*p<0,05, em relação a C-S na mesma semana); a partir da 14<sup>a</sup> semana, ANOVA (p<0,05) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

Observa-se que a glicemia basal dos animais MSG foi maior em relação a C-S, enquanto MSG-E apresentou menor glicemia, em relação a C-S, nos tempos 30 e 60 minutos (Figura 30A). Não houve diferença entre os grupos na análise da AUC (C-S:  $26884,3 \pm 1150,6$ ; MSG:  $25230 \pm 3105$ ; MSG-E:  $22337,6 \pm 857,2$ ) (Figura 30B).



**Figura 30.** Glicemia de jejum (A) e AUC (B) do Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) dos animais controles saudáveis (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

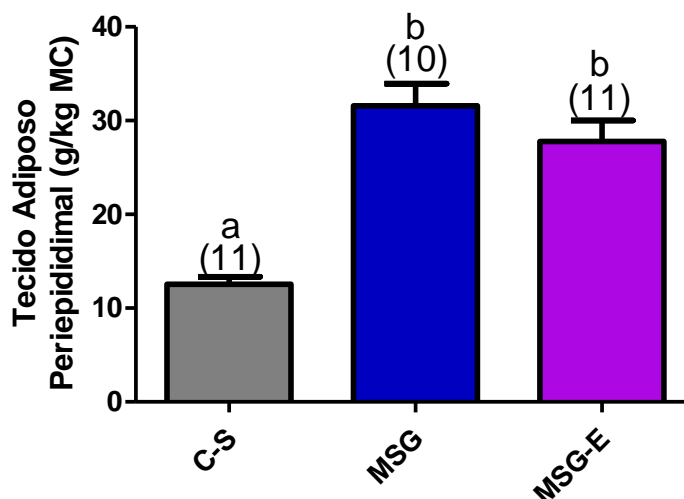
Não houve diferença da glicemia entre os grupos durante o ITT (Figura 31A). O Kitt foi maior em MSG-E ( $2,06 \pm 0,003$ ) em relação à MSG ( $1,04 \pm 0,005$ ), porém ainda foi menor que em C-S ( $6,24 \pm 0,028$ ) (Figura 31B).



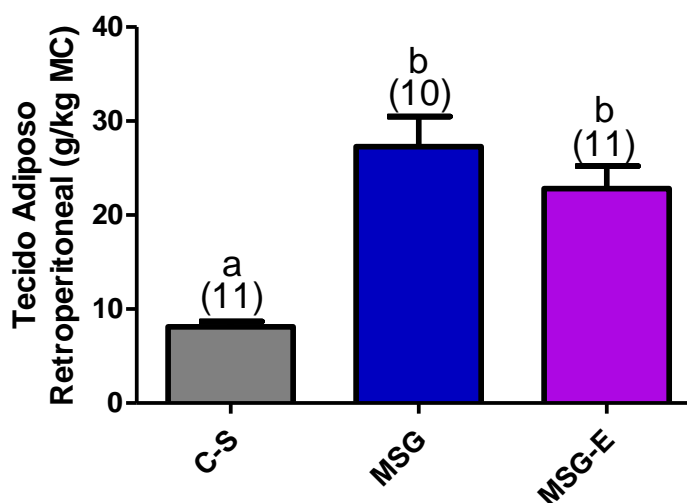
**Figura 31.** Glicemia de jejum (A) e Kitt (B) do Teste de Tolerância à Insulina (ITT) dos animais controles saudáveis (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



A massa relativa do tecido adiposo periepídídimo (C-1521 S:  $12,56 \pm 0,80$ ; MSG:  $31,60 \pm 2,36$ ; MSG-E:  $27,78 \pm 2,24$ ) e retroperitoneal (C-S:  $8,13 \pm 0,57$ ; MSG:  $27,3 \pm 3,20$ ; MSG-E:  $22,82 \pm 2,40$ ) (Figura 32 e 33) foi maior em MSG e MSG-E, em relação a C-S.

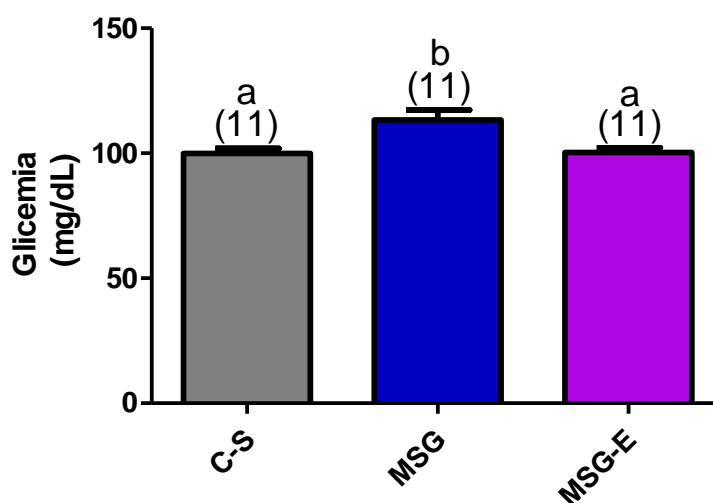


**Figura 32.** Massa do tecido adiposo periepídídimo dos animais controles sádios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



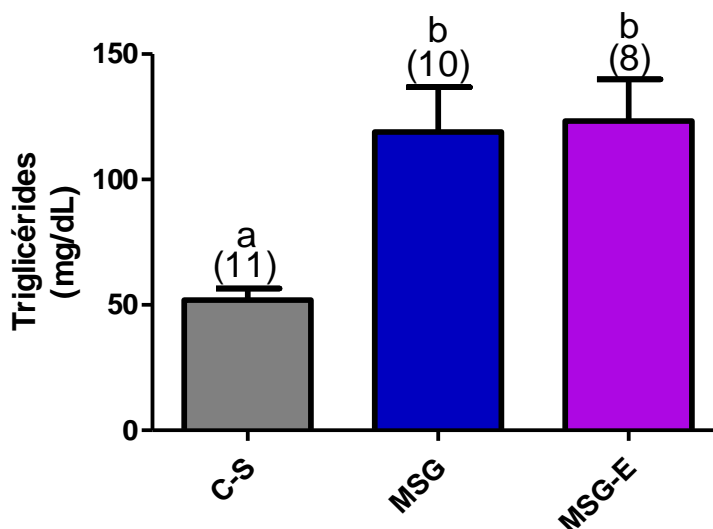
**Figura 33.** Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos animais controles sádios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

A Figura 34 mostra que a glicemia de MSG (113,27±4,03) foi maior, em relação a C-S (99,91±2,06) e MSG-E (100,36±1,76).



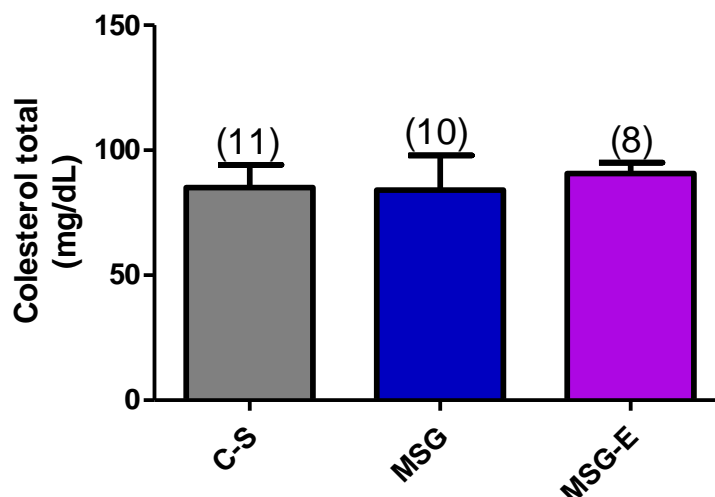
**Figura 34.** Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p<0.05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p<0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Os níveis de TG (Figura 35) foram maiores em MSG (118,89±17,96) e MSG-E (123,25±16,64), em relação a C-S (51,92±4,70).

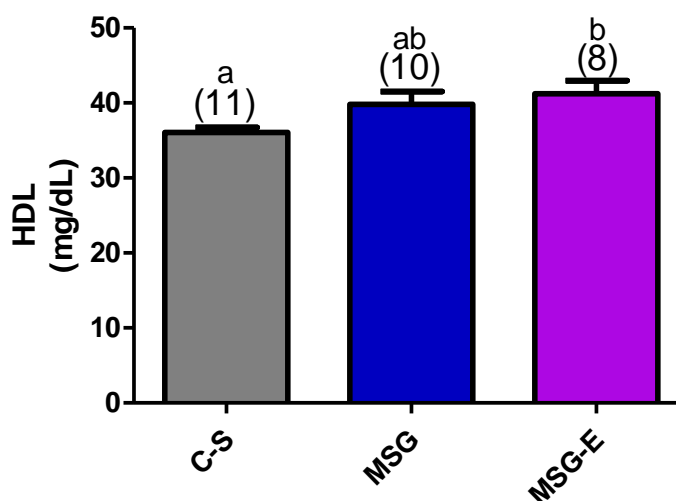


**Figura 35.** TG dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p<0.05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p<0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Não houve diferença estatística nos níveis de colesterol total entre C-S, MSG e MSG-E (C-S:  $85,06 \pm 9,17$ ; MSG:  $84,04 \pm 13,92$ ; MSG-E:  $90,73 \pm 4,27$ ) (Figura 36). Os níveis de HDL colesterol foram maiores em MSG-E ( $41,22 \pm 1,75$ ), em relação ao C-S ( $36,08 \pm 0,66$ ) (Figura 37).

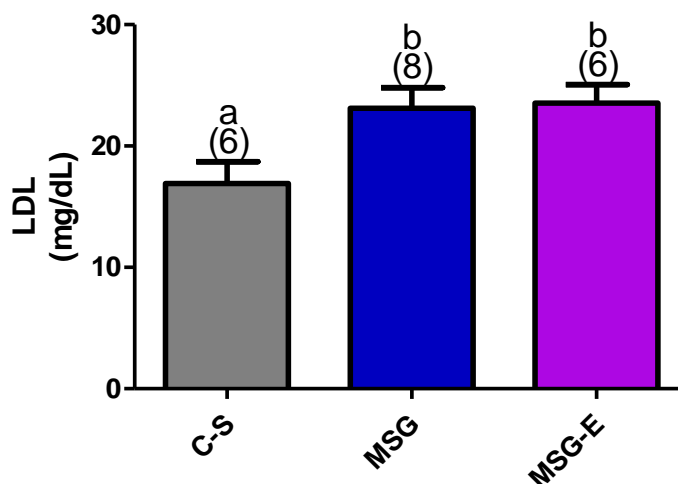


**Figura 36.** Colesterol total dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E.

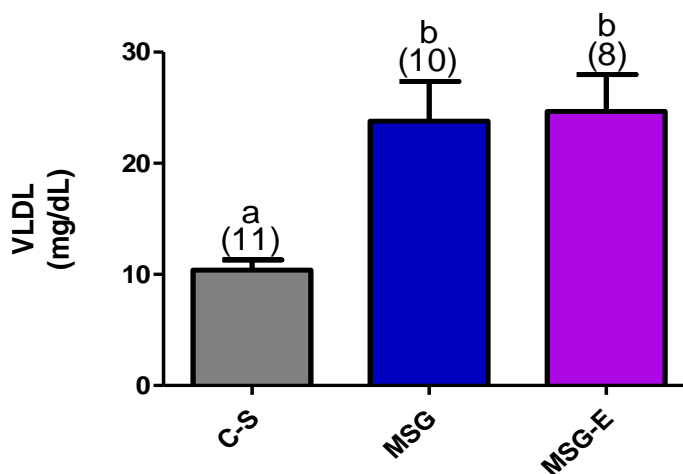


**Figura 37.** HDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Os níveis de LDL (C-S: 16,91±1,81; MSG: 23,11±1,71; MSG-E: 23,53±1,52) e VLDL (C-S: 10,38±0,94; MSG: 23,78±3,59; MSG-E: 24,65±3,33) colesterol foram maiores em MSG e MSG-E, em relação a C-S (Figuras 38 e 39).

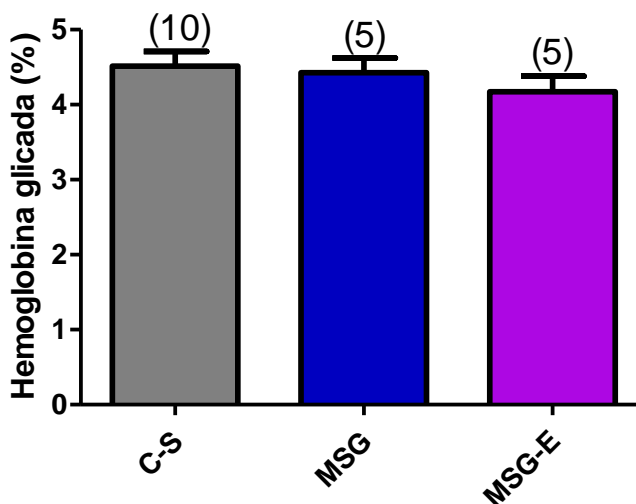


**Figura 38.** LDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

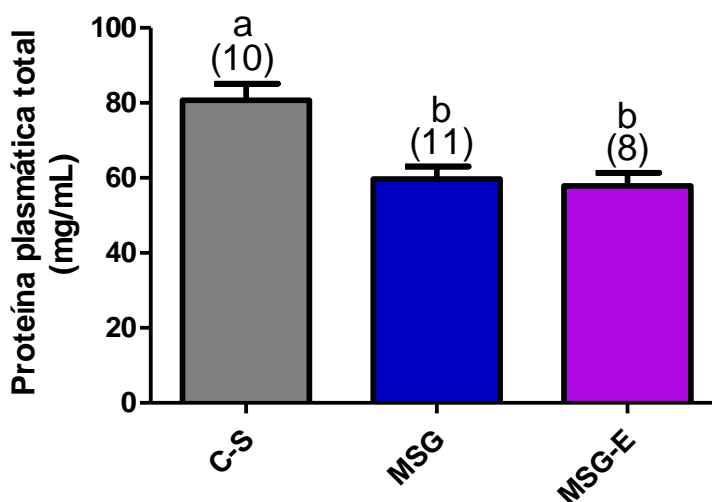


**Figura 39.** VLDL colesterol dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Não houve diferença na HbA1c entre C-S, MSG e MSG-E (C-S:  $4,52 \pm 0,19$ ; MSG:  $4,43 \pm 0,19$ ; MSG-E:  $4,17 \pm 0,21$ ) (Figura 40). Houve diminuição no teor de proteínas plasmáticas em MSG ( $59,70 \pm 3,39$ ) e MSG-E ( $57,88 \pm 3,74$ ), em relação a C-S ( $80,70 \pm 4,46$ ) (Figura 41).

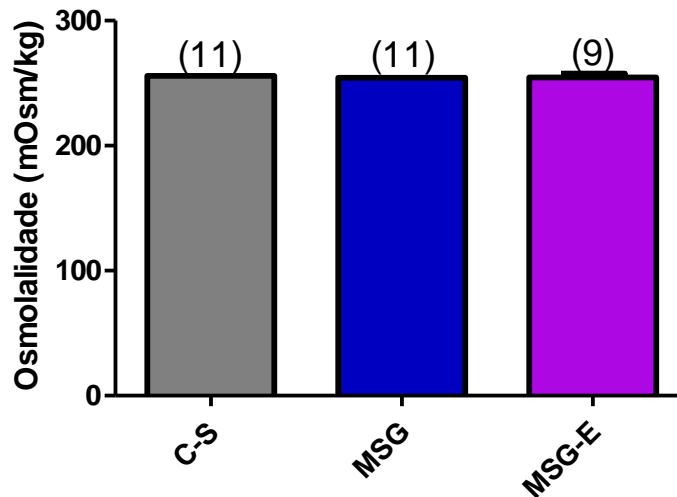


**Figura 40.** HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E.

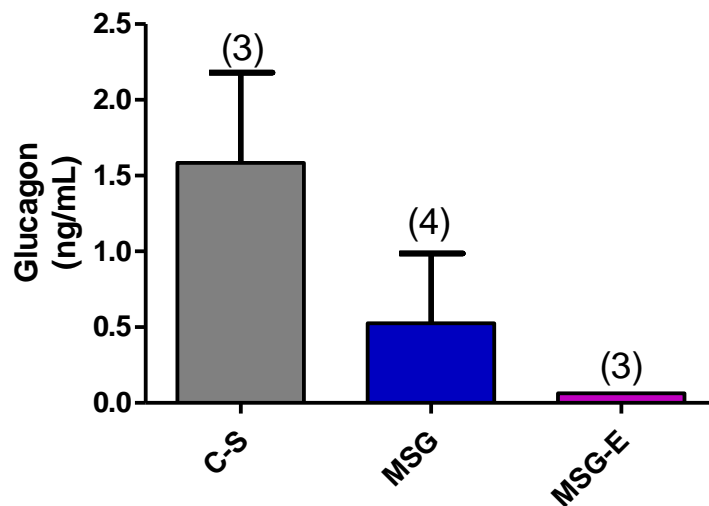


**Figura 41.** Proteína plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Não houve diferença da osmolalidade plasmática (C-S:  $255,82 \pm 2,33$ ; MSG:  $254,36 \pm 5,26$ ; MSG-E:  $254,67 \pm 3,08$ ) e no teor de glucagon secretado por ilhotas pancreáticas isoladas entre C-S, MSG e MSG-E (C-S:  $1,58 \pm 0,60$ ; MSG:  $0,53 \pm 0,46$ ; MSG-E:  $0,06 \pm 0,00$ ) (Figura 42 e 43).

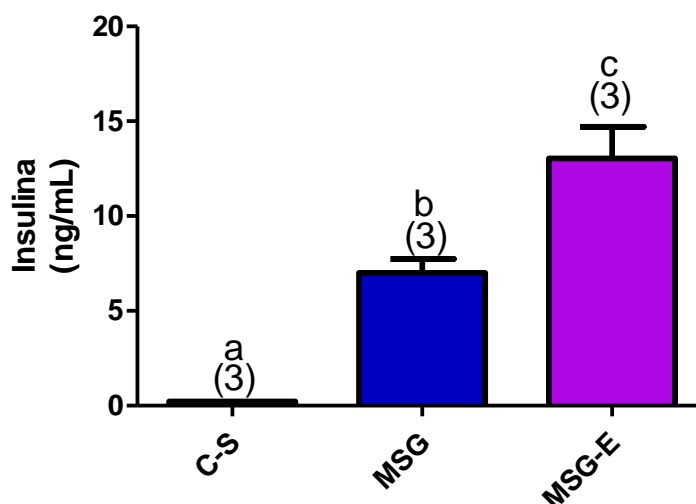


**Figura 42.** Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E.



**Figura 43.** Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E.

Houve aumento na secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de MSG (7,00±0,74) e MSG-E (13,04±1,66) em relação a C-S (0,23±0,00), sendo MSG-E também maior que MSG (Figura 44).



**Figura 44.** Secreção de insulina de ilhotas pancreática isoladas dos animais controles sadios (C-S), com obesidade induzida por glutamato monossódico sem (MSG) e com tratamento com exenatida (MSG-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x MSG x MSG-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

#### 5.4 STZ

Não houve diferença estatística na MC absoluta (g) e CNA (cm) entre C-S e STZ na primeira semana após o desmame (4ª semana) (Tabela 4).

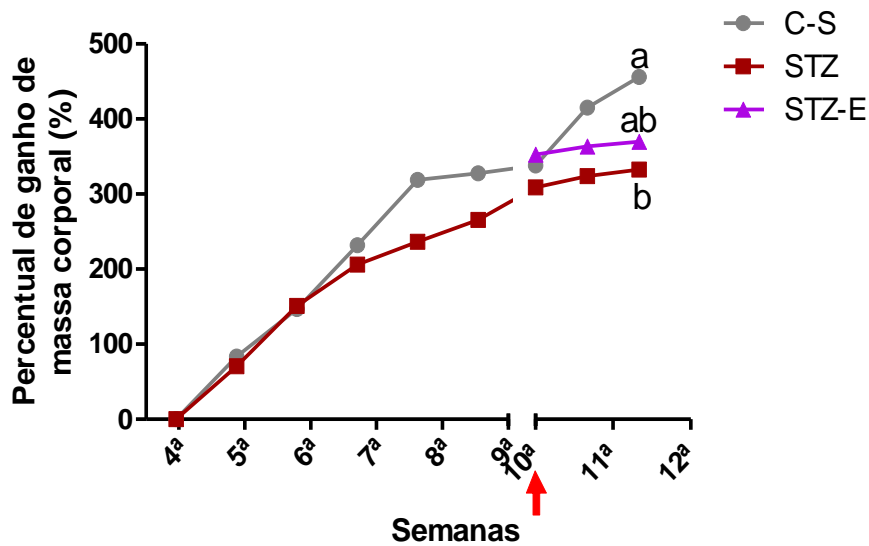
**Tabela 4.** MC absoluta e CNA dos grupos C-S de STZ na primeira semana após o desmame (4ª semana).

	N	MC (g)	CNA (cm)
		4ª semana	4ª semana
<b>C-S</b>	10	71,7 ± 3,02	12,4 ± 0,49
<b>STZ</b>	17	75,2 ± 2,84	12,7 ± 0,23

Valores são média±SEM. Teste t Student não pareado, bicaudal, STZ x C-S, ( $p > 0,05$ ).

As Figuras 45 a 64 mostram os dados morfométricos e metabólicos dos animais STZ, STZ-E e C-S, obtidos a partir do desmame (21 dias de idade) até completarem 2 meses e 20 dias. A MC e o CNA são dados em porcentagem relativa à MC e CNA inicial (1ª semana após o desmame) do mesmo animal.

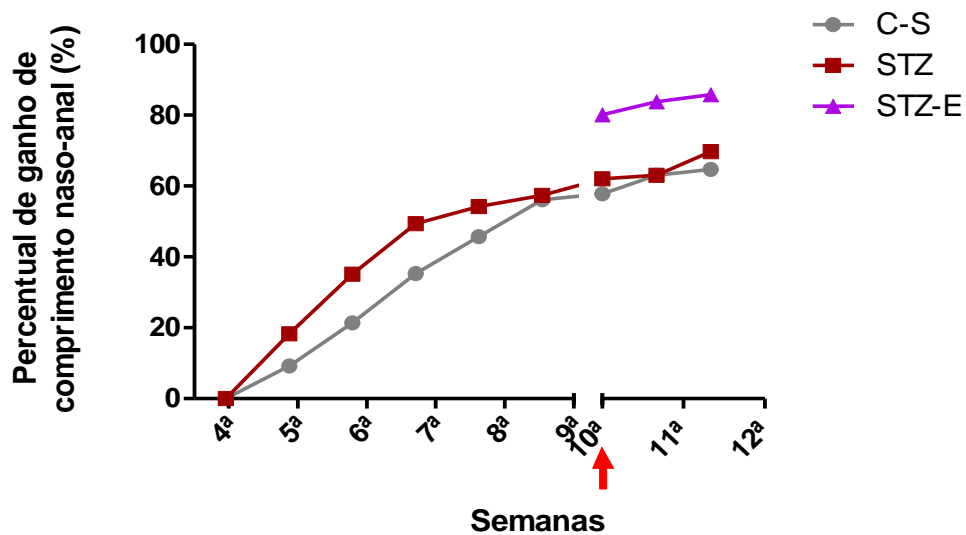
A Figura 45 mostra que na 12ª semana, houve diminuição no ganho de MC em STZ, em relação a C-S e STZ-E. Ao final do experimento, o aumento do ganho de MC em cada grupo, em relação ao início dos experimentos, foi: 456,2% em C-S, 332,6% em STZ e 369,9% em STZ-E.



**Figura 45.** Percentual de ganho de MC dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7) e STZ-E (n=10) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 9ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S na mesma semana); a partir da 10ª semana, ANOVA (p<0.05) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls, (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma semana).

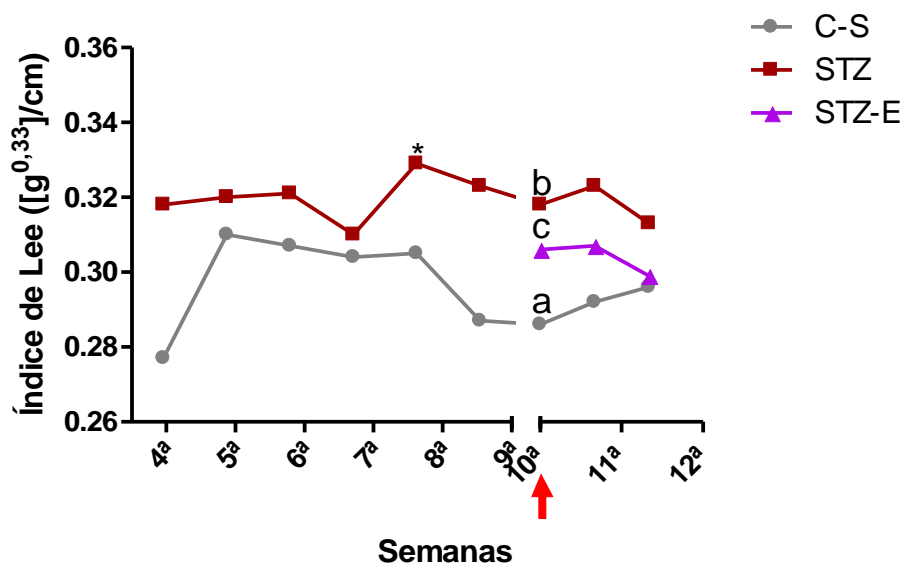


A Figura 46 mostra que não houve diferença no ganho de CNA entre STZ, STZ-E e C-S. Ao final do experimento, o aumento do ganho de CNA em cada grupo, em relação ao início dos experimentos, foi: 64,7% em C-S, 69,7% em STZ e 85,8% em STZ-E.



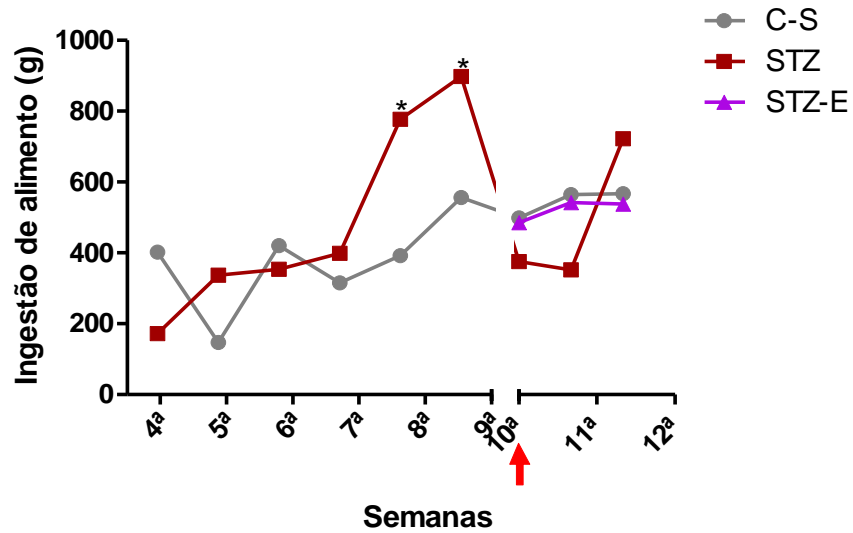
**Figura 46.** Percentual de ganho de CNA dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7) e STZ-E (n=10) em relação à primeira semana após o desmame (4ª semana = porcentagem inicial, ganho = 0). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 9ª semana ( $p > 0,05$ , em relação a C-S na mesma semana); a partir da 10ª semana, ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

Na Figura 47, observa-se que o índice de Lee de STZ na 8ª semana foi maior, em relação a C-S. Na 10ª semana, o índice de Lee de STZ e STZ-E foi maior em relação a C-S, sendo STZ também maior que STZ-E, porém na 11ª e 12ª semanas o índice de Lee de STZ e STZ-E se igualou ao de C-S.



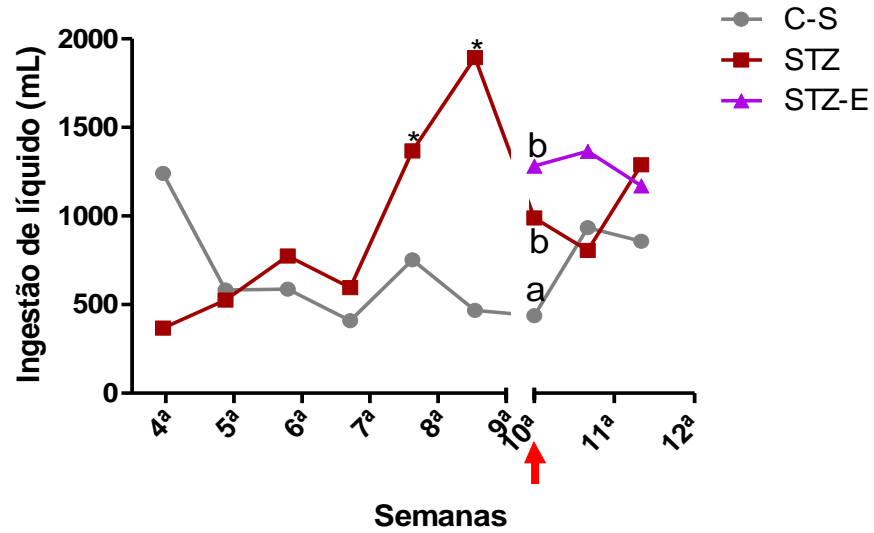
**Figura 47.** Índice de Lee dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtido a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 9ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 10ª semana, ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos na mesma semana).

O grupo STZ apresentou aumento na ingestão de alimento (Figura 48) na 8ª e 9ª semana, em relação a C-S. A partir da 10ª semana a ingestão de alimento foi igual entre C-S, STZ e STZ-E.



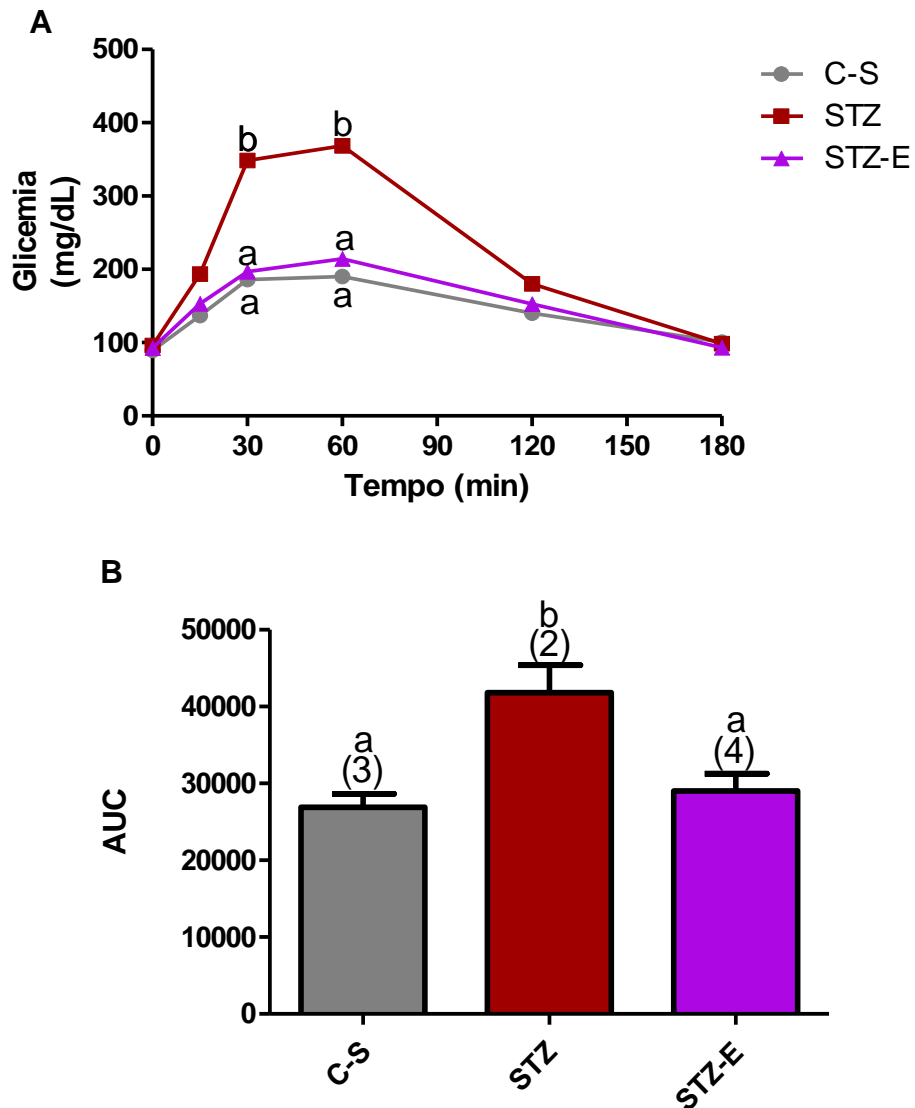
**Figura 48.** Ingestão de alimento dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtida a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida). Valores são média  $\pm$  SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 9ª semana (\* $p < 0,05$ , em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 10ª semana, ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

A ingestão de líquido (Figura 49) de STZ foi menor na 4ª semana e maior na 8ª e 9ª semanas em comparação a C-S. Na 10ª semana, o consumo de líquido do STZ e STZ-E foi maior quando comparado a C-S.



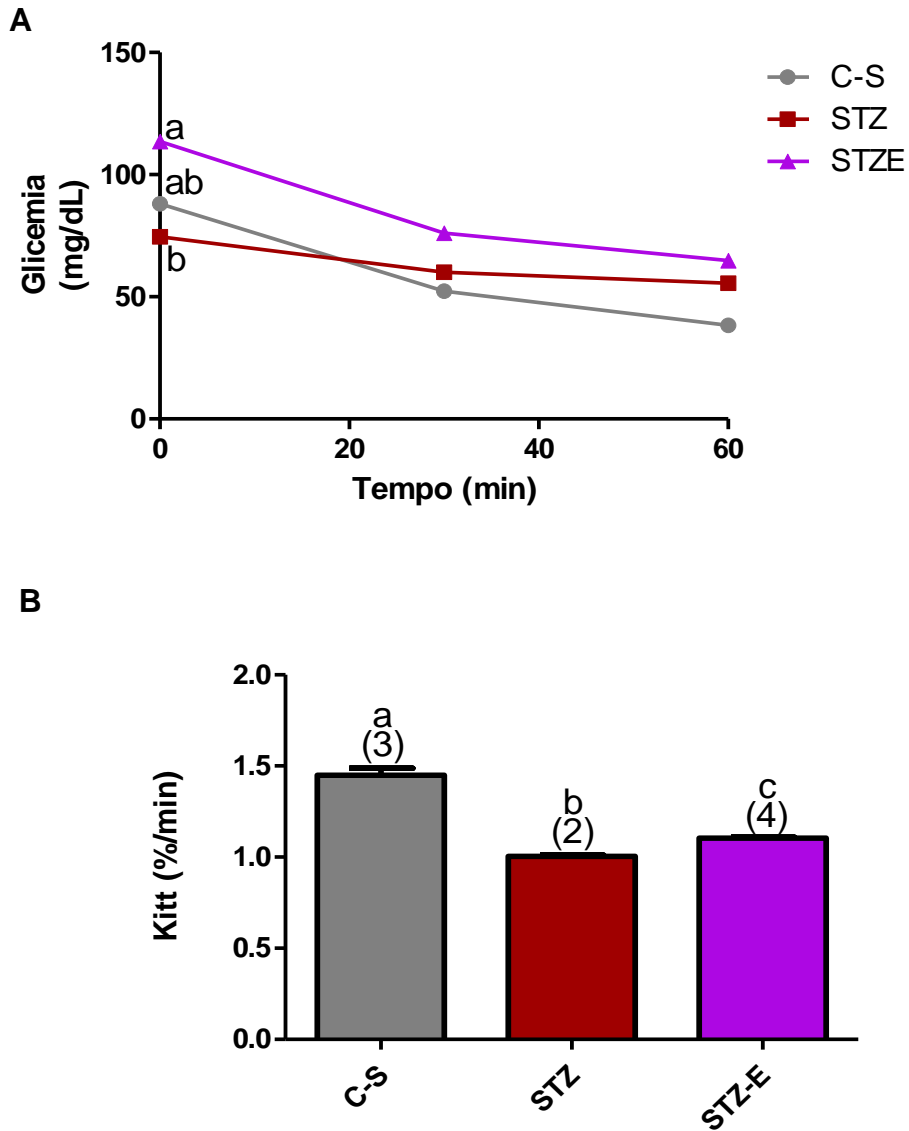
**Figura 49.** Ingestão de líquido dos grupos C-S (n=10), STZ (n=7), STZ-E (n=10) obtida a partir da primeira semana após o desmame (4ª semana de vida). Valores são média ± SEM. A seta indica a semana de início do tratamento com exenatida. Teste t Student não pareado, bicaudal, até a 9ª semana (\*p<0,05, em relação a C-S numa mesma semana); a partir da 10ª semana, ANOVA (p<0.05) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls (p<0,05, letras diferentes indicam diferenças entre os grupos na mesma semana).

Durante o experimento de OGTT, os animais STZ apresentaram maior glicemia nos tempos 30 e 60 minutos (Figura 50A) e aumento na área sob a curva (41802±3604) (Figura 50B), em relação a C-S (26895±1745) e STZ-E (29020±2231).



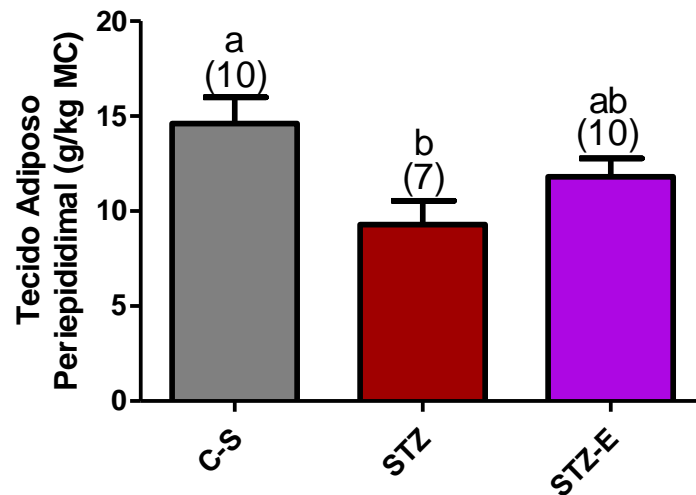
**Figura 50.** Glicemia de jejum (A) e AUC (B) do Teste de Tolerância à Glicose (OGTT) dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

A glicemia basal dos animais STZ-E no experimento de ITT foi maior em relação à STZ (Figura 51A). O Kitt também foi maior em STZ-E ( $1,104 \pm 0,004$ ) em relação à STZ ( $1,004 \pm 0,006$ ), porém ainda foi menor que em C-S ( $1,449 \pm 0,038$ ) (Figura 51B).

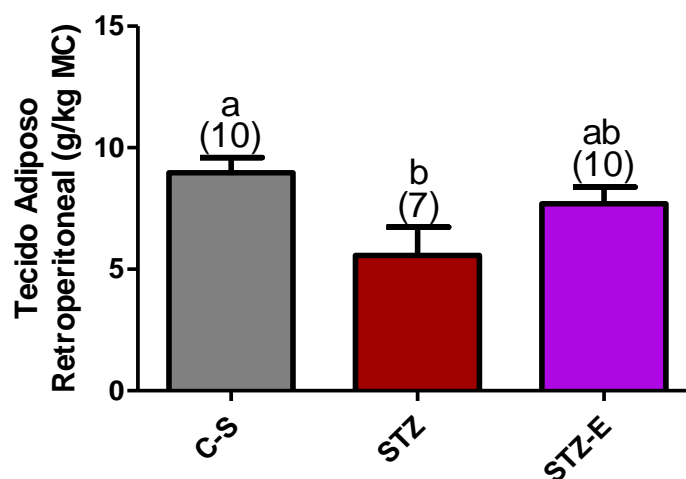


**Figura 51.** Glicemia de jejum (A) e Kitt (B) do Teste de Tolerância à Insulina (ITT) dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Na Figura 52 observa-se que a massa relativa do tecido adiposo periepídidimo foi maior em C-S ( $14,61 \pm 1,37$ ) que em STZ ( $9,29 \pm 1,25$ ), sendo que ambos não diferiram de STZ-E ( $11,80 \pm 0,97$ ). A massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 53) foi maior em C-S ( $8,96 \pm 0,63$ ) que em STZ ( $5,56 \pm 1,16$ ), sendo que ambos não diferiram de STZ-E ( $7,70 \pm 0,69$ ).

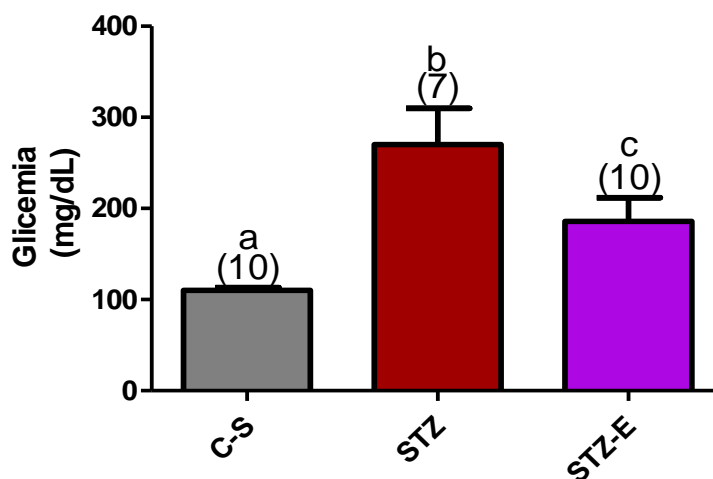


**Figura 52.** Massa do tecido adiposo periepídidimo dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

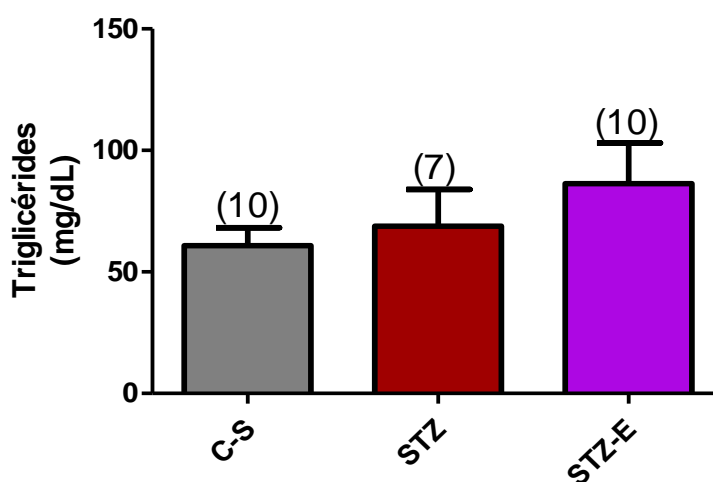


**Figura 53.** Massa do tecido adiposo retroperitoneal dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

A Figura 54 mostra que a glicemia de STZ ( $270 \pm 39,83$ ) e STZ-E ( $185,8 \pm 26,11$ ) foi maior em relação ao C-S ( $110 \pm 3,015$ ), sendo STZ ainda maior que STZ-E. Não houve diferença nos níveis de TG entre C-S, STZ e STZ-E (C-S:  $60,80 \pm 7,399$ ; STZ:  $68,78 \pm 15,10$ ; STZ-E:  $86,28 \pm 16,73$ ) (Figura 55).



**Figura 54.** Glicemia dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

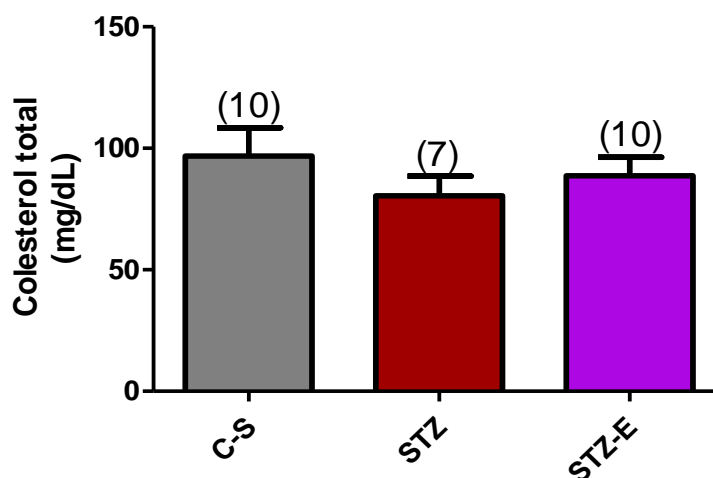


**Figura 55.** TG dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média $\pm$ SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

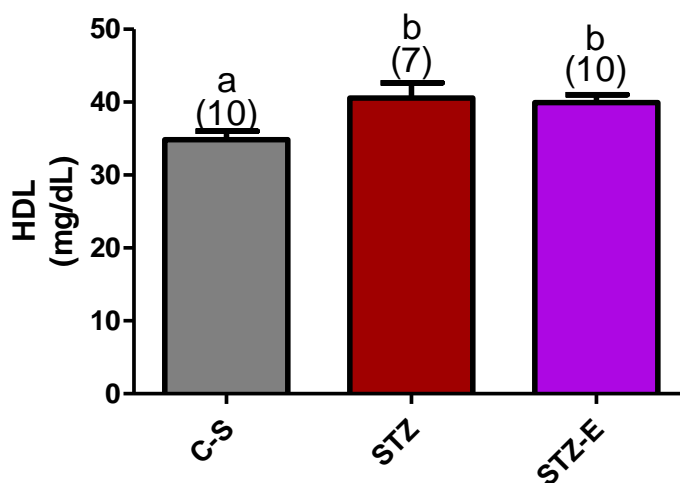
Não houve diferença nos níveis de colesterol total entre C-S, STZ e STZ-E (C-S:  $96,84 \pm 11,54$ ; STZ:  $80,39 \pm 8,197$ ; STZ-E:  $88,73 \pm 7,538$ ) (Figura 56). Os níveis de



HDL colesterol foram maiores em STZ (40,55±2,094) e STZ-E (39,94±1,059) em relação a C-S (34,85±1,193) (Figura 57).

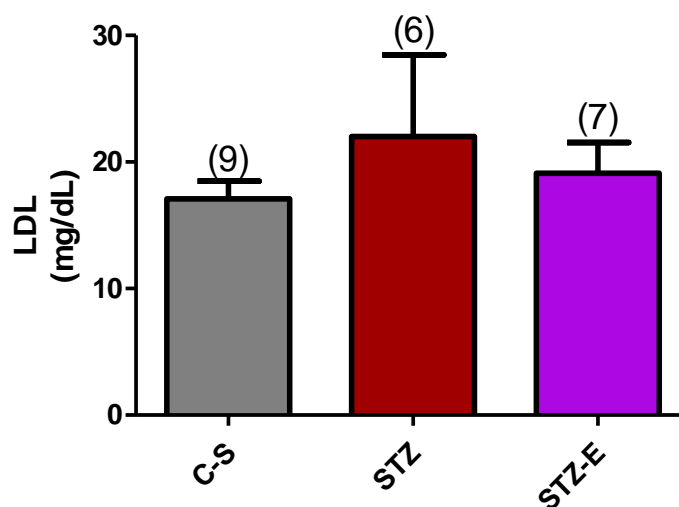


**Figura 56.** Colesterol total dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

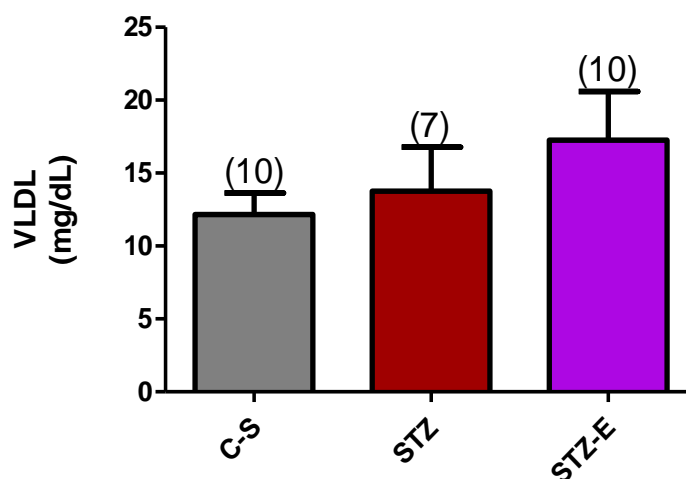


**Figura 57.** HDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p<0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p<0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

Não houve diferença nos níveis de LDL (C-S: 17,09±1,388; STZ: 22,01±6,461; STZ-E: 19,11±2,431) e VLDL colesterol entre C-S, STZ e STZ-E (C-S: 12,16±1,480; STZ: 13,76±3,019; STZ-E: 17,26±3,347) (Figura 58 e 59).

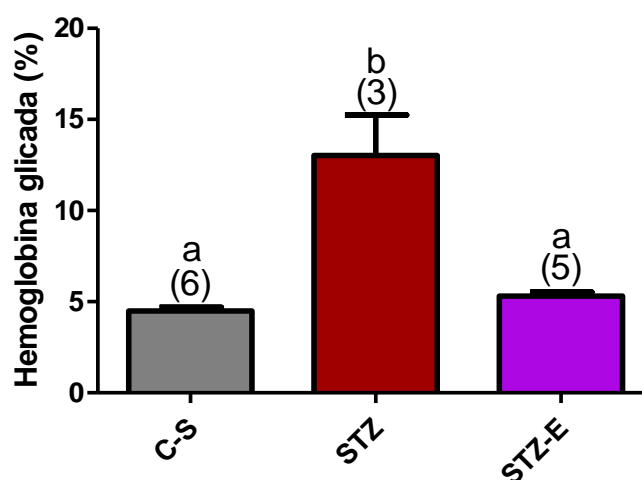


**Figura 58.** LDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

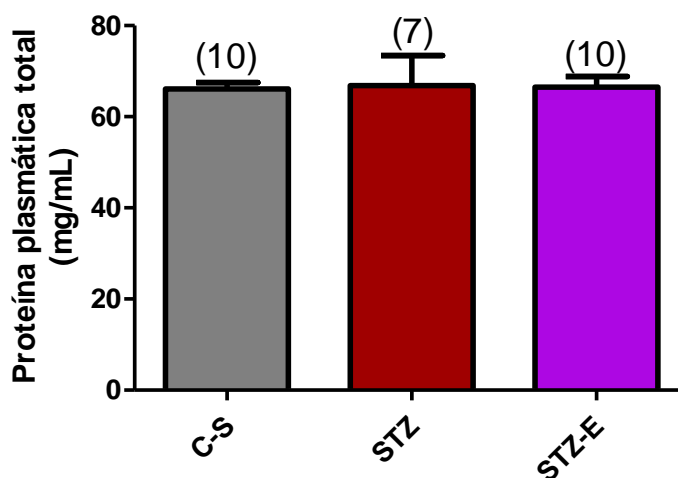


**Figura 59.** VLDL colesterol dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

A HbA1c foi maior em STZ ( $13,02 \pm 2,229$ ) em relação a C-S ( $4,496 \pm 0,193$ ) e STZ-E ( $5,304 \pm 0,227$ ) (Figura 60). Não houve diferença no teor de proteínas plasmáticas entre C-S, STZ e STZ-E (C-S:  $66,10 \pm 1,405$ ; STZ:  $66,83 \pm 6,590$ ; STZ-E:  $66,52 \pm 2,347$ ) (Figura 61).

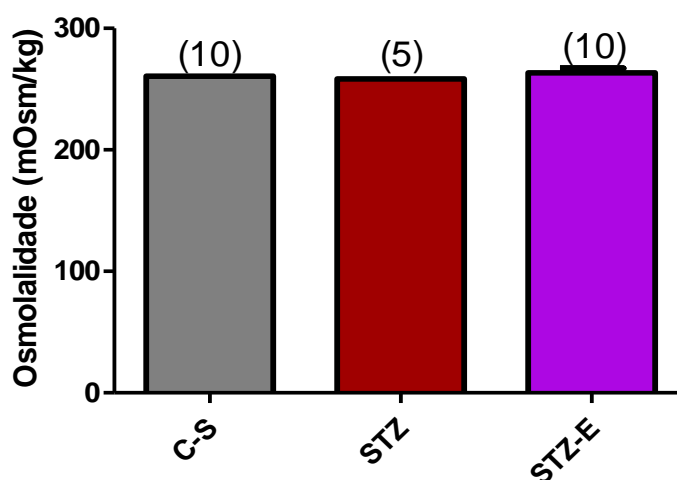


**Figura 60.** HbA1c dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste post hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).



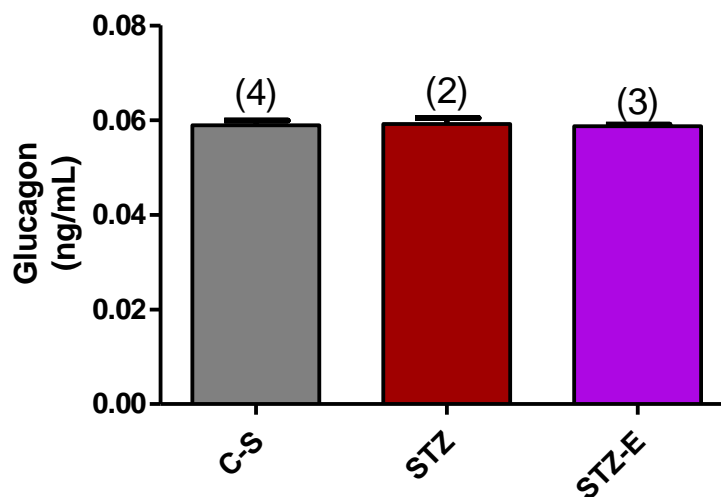
**Figura 61.** Proteína plasmática dos controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p > 0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

Não houve diferença na osmolalidade plasmática entre C-S, STZ e STZ-E (C-S:  $260,6 \pm 1,875$ ; STZ:  $258,4 \pm 1,990$ ; STZ-E:  $3,902$ ) (Figura 62).



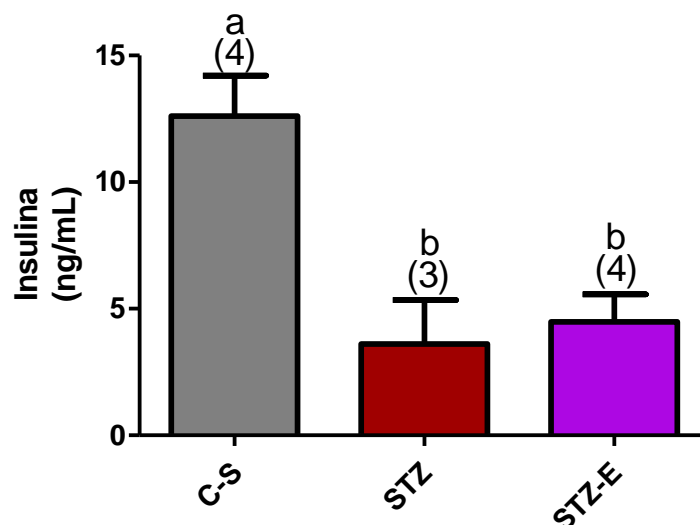
**Figura 62.** Osmolalidade plasmática dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

Não houve diferença no teor de glucagon secretado por ilhotas pancreáticas entre C-S, STZ e STZ-E (C-S:  $0,058\pm0,000$ ; STZ:  $0,059\pm0,001$ ; STZ-E:  $0,058\pm0,000$ ) (Figura 63).



**Figura 63.** Secreção de glucagon de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles sadios (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p>0.05$ ) C-S x STZ x STZ-E.

A secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas foi menor em STZ ( $3,604 \pm 1,734$ ) e STZ-E ( $4,482 \pm 1,087$ ) em relação a C-S ( $12,61 \pm 1,596$ ) (Figura 64).



**Figura 64.** Secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas dos animais controles saudáveis (C-S), com DM induzido por estreptozotocina sem (STZ) e com tratamento com exenatida (STZ-E). Valores são média±SEM. Número de animais entre parênteses. ANOVA ( $p < 0,05$ ) C-S x STZ x STZ-E, seguido de teste pos hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ , letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

### 5.5. Comparação dos parâmetros morfométricos e metabólicos entre os modelos de obesidade MSG e DIO

Na Tabela 5 foram comparados os parâmetros morfométricos e metabólicos entre MSG e DIO.

Os animais MSG apresentaram maior ganho de MC e CNA, maior índice de Lee e ingestão de alimento, em relação a DIO. Já os animais DIO apresentaram maiores níveis de TG, VLDL, HbA1c, proteína plasmática, secreção de insulina e menor Kitt, em relação à MSG.

**Tabela 5.** Comparação dos valores dos parâmetros morfométricos e metabólicos entre os modelos de obesidade MSG e DIO.

	<b>MSG</b> Idade: 110 dias MC.I.: 72,5 g MC.F.: 371 g	<b>DIO</b> Idade: 140 dias MC.I.: 321,9 g MC.F.: 538 g
<b>MC (%)</b>	509,5 ± 30,81 (10)	178,1 ± 7,84 * (11)
<b>CNA (%)</b>	164,5 ± 3,4 (10)	126,3 ± 3,5 * (7)
<b>Índice de Lee</b>	0,349 ± 0,006 (10)	0,315 ± 0,002 * (11)
<b>Ingestão de alimento (g)</b>	76,049 ± 3,801 (7)	51,1 ± 0,029 * (4)
<b>Ingestão de líquido (mL)</b>	90,67 ± 6,960 (6)	76,63 ± 11,07 (8)
<b>Tecido adiposo periepididimal (g/kg MC)</b>	31,60±2,362 (10)	34,02±1,858 (11)
<b>Tecido adiposo retroperitoneal (g/kg MC)</b>	27,28± 3,208 (10)	32,90± 3,721 (11)
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	113,27 ± 4,03 (11)	124,18 ± 4,02 (11)
<b>AUC</b>	25230 ± 3105 (2)	28490 ± 1571 (4)
<b>Kitt (%/min)</b>	1,044 ± 0,005 (2)	0,35547 ± 0,002 * (4)
<b>TG (mg/mL)</b>	118,9 ± 17,96 (10)	302,2 ± 39,71* (10)
<b>Colesterol total (mg/mL)</b>	84,04 ± 13,92 (10)	103,4 ± 10,85 (10)
<b>HDL (mg/mL)</b>	39,82 ± 1,17 (10)	40,54 ± 1,84 (10)
<b>LDL (mg/mL)</b>	23,11 ± 1,71 (8)	20,04 ± 1,05 (8)
<b>VLDL (mg/mL)</b>	23,78 ± 3,59 (10)	60,44 ± 7,94* (10)
<b>HbA1c (%)</b>	4,43 ± 0,19 (5)	11,57 ± 1,68* (4)
<b>Proteína plasmática (mg/mL)</b>	59,7 ± 3,38 (11)	79,13 ± 3,18* (8)
<b>Osmolalidade plasmática</b>	254,4 ± 5,26 (11)	264,4 ± 3,10 (10)
<b>Secreção glucagon (ng/mL)</b>	0,066 ± 0,0025 (3)	0,064 ± 0,0029 (3)
<b>Secreção de insulina (ng/mL)</b>	7,0 ± 0,74 (3)	16,84 ± 0,80* (4)

Valores são média ± SEM. MC.I.: massa corporal inicial; MC.F.: massa corporal final. Número de animais entre parênteses. Teste t Student não pareado, bicaudal (\*p<0,05, em relação à MSG, num mesmo parâmetro).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Parâmetros morfométricos e metabólicos

#### 6.1.1 DIO

O modelo de dieta hiperlipídica é amplamente usado para o estudo da obesidade e síndrome metabólica em roedores (BUETTNER *et al.*, 2006, 2007; HARIRI e THIBAUT, 2010). As principais vantagens deste modelo são suas consequências fisiopatológicas e semelhança com a etiologia da doença humana (CORTEZ *et al.*, 2013). Porém, a contribuição de modelos de dieta hiperlipídica na compreensão da etiologia da obesidade e da síndrome metabólica tem sido limitada devido ao uso frequente de rações com distintas composições, baixa densidade de nutrientes e adição de ingredientes impuros (CORTEZ *et al.*, 2013).

A dieta de “cafeteria” é um subtipo de dieta hipercalórica que inclui alimentos de consumo humano enriquecidos com açúcares refinados e ácidos graxos saturados (DIETRICH *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; LINDQVIST *et al.*, 2008; BARTOLOMUCCI *et al.*, 2009). Sabe-se que até aproximadamente 100 dias de idade o aumento na MC de roedores é devido, principalmente, ao aumento da massa muscular (BAGNOL *et al.*, 2012), mas com esta dieta os animais ganham peso e tornam-se obesos mais rapidamente do que com dietas hiperlipídicas, devido a uma maior ingestão de alimento, como consequência da maior palatabilidade (WEST e YORK, 1998). No entanto, o problema desta abordagem é que a composição real dos macronutrientes na dieta pode ser muito variável, impedindo o isolamento dos fatores dietéticos essenciais e de sua influência na análise pretendida (SPEAKMAN *et al.*, 2008).

No presente estudo, os constituintes da ração peletizada, utilizada para indução da obesidade, foram selecionados e combinados de modo a prover a densidade energética específica e desejada, qual seja 5,2 kcal/g, adicionalmente a 1,2 kcal/mL fornecido pela solução de sacarose 30% para beber *ad libitum*. Comparativamente à ração normal, a ração aqui usada para a indução da DIO é essencialmente hiperlipídica (8 x maior), com ligeira diminuição do conteúdo de

proteínas (0,6 x), carboidratos (0,7 x), matérias fibrosas (0,6 x) e vitaminas e minerais (0,7 x), proporcionando, juntamente com a solução para beber, cerca do dobro da densidade energética, mas evitando os efeitos diretos ou indiretos da ingestão de nutrientes desconhecidos. Assim, as características desse regime de indução tentam mimetizar a dieta de “cafeteria” sem a utilização de componentes industrializados para consumo humano, os quais muitas vezes não são identificados e/ou são impuros, conforme já mencionado.

O presente estudo mostra que a dieta DIO promoveu ganho de MC, em conformidade com o que é descrito para a dieta hiperlipídica (LLADÓ *et al.*, 1995) e, também, diminuição da ingestão de alimento. Os sinais hormonais produzidos na periferia em resposta às oscilações dos níveis de nutrientes exercem efeito no controle da adiposidade e no controle imediato da fome. A leptina é o mais importante sinal periférico responsável por estabelecer uma conexão entre os sítios de estoque de energia e o SNC (BENATTI e JÚNIOR, 2007). Dessa forma, o aumento de MC aqui observado nos animais DIO deve acarretar aumento da leptina, a qual sinaliza a saciedade, diminuindo a ingestão alimentar. Sabe-se que a regulação da produção de leptina é correspondente às variações da massa do tecido adiposo, e que a insulina também desempenha um papel intermediário no controle da adiposidade, além do controle imediato da fome e potenciação dos sinais da leptina (CARVALHEIRA *et al.*, 2003). Nos modelos DIO e MSG utilizados no presente estudo, os quadros de hiperinsulinemia e hiperleptinemia são característicos (CESARETTI e JUNIOR, 2006). O aumento dos depósitos de tecido adiposo periepididimal e retroperitoneal dos animais DIO confirmam relato de White *et al.* (2013) sugerindo que, comparativamente a outros esquemas de dieta (HILL *et al.*, 1993; SHILLABEER e LAU, 1994), neste modelo a obesidade é gerada de forma consistente, apesar do período relativamente mais curto de dieta (10 semanas). Os sinais neurais originam-se no trato digestivo e oferecem informações momentâneas a respeito da ingestão e absorção de nutrientes. Tais sinais são carreados ao SNC pelo nervo vago, alcançando o núcleo do trato solitário (NTS) (HOWARD e FLIER, 2006). A partir dos núcleos hipotalâmicos e NTS, os sinais avançam em direção a outras regiões do SNC para coordenar a ingestão de alimentos, gerando sinais de saciedade e fome (HOWARD e FLIER, 2006). No presente estudo, o tratamento dos animais DIO com exenatida reduziu a massa do depósito de tecido adiposo



retroperitoneal e não alterou a massa do depósito de tecido adiposo periepídidimo (adiposidade). Sabe-se que o GLP-1, quando atua centralmente, desempenha papel na supressão da ingestão alimentar por necessidades metabólica e hedônica (TRAPP e RICHARDS, 2013). Dessa forma, a diminuição da adiposidade em DIO-E sugere a provável interação da exenatida administrada nos animais DIO com receptores para GLP-1 presentes no NTS, evidenciando sua eficácia em diminuir a ingestão de alimento e, conseqüentemente, melhorando o quadro de obesidade.

No outro extremo do controle do fluxo de energia por sinais periféricos, qual seja o controle imediato da saciedade, encontra-se um grupo de hormônios produzidos pelo trato digestivo, sendo um deles o GLP-1, com papel anorexígeno. Uma das funções do GLP-1 é o retardamento do esvaziamento gástrico. Tal qual o GLP-1, a exenatida prolonga a sensação de saciedade e, atua, dessa forma, na redução da MC conseqüente à menor ingestão de alimento no grupo DIO-E.

A indução de obesidade DIO (com ou sem exenatida) não promoveu alteração persistente na ingestão líquida em relação aos controles, mostrando que não há influência da palatabilidade da solução de sacarose e do conteúdo hiperlipídico da ração sobre o consumo de líquido. Sabe-se que a ingestão de sacarose diminui o consumo de energia na refeição seguinte, pois a energia da sacarose é compensada pela redução da ingestão de energia proveniente de outras fontes (SALMENKALLIO-MARTTILA *et al.*, 2009). Após a primeira semana de exposição à dieta hiperlipídica, há tendência de compensar a alta densidade energética da dieta ingerindo menor quantidade de alimento (HARIRI e THIBAUT, 2010). Além disso, sabe-se também que no início de uma dieta hiperlipídica os animais são sensíveis ao efeito anorexígeno da leptina, embora mesmo com a redução da ingestão de alimento tornem-se obesos em função do aumento da eficiência da alimentação proporcionado pelo excesso de gordura (97-98% de eficiência). Este aumento conduz a um aumento nos níveis de leptina plasmática, seguido pela insensibilidade à sua ação (STUBBS *et al.*, 2004; HARIRI e THIBAUT, 2010). Durante o tratamento com exenatida, a dieta DIO não alterou o CNA do grupo DIO-E em relação ao grupo DIO. No entanto, os animais DIO tiveram aumento do CNA em relação a C-S, indicando que a alta densidade energética da dieta influencia o crescimento dos animais. Obviamente, o aumento do índice de Lee dos grupos DIO e DIO-E em relação aos controles decorre da desproporcionalidade

entre MC e CNA nestes animais; porém houve redução do índice de Lee em DIO-E, em relação a DIO, indicando, mais uma vez, a eficácia da exenatida em melhorar o quadro de obesidade, diminuindo a MC e a massa do tecido adiposo retroperitoneal, além de reduzir a glicemia.

Alguns estudos demonstraram que alterações na resistência à insulina são independentes da adiposidade, mas estão estreitamente relacionadas com a quantidade e o tipo de gordura ingerida (PAGLIASSOTTI *et al.*, 2000), em especial ao tamanho e número de insaturações das mesmas (STEIN *et al.*, 1997). A utilização de ácidos graxos livres, derivados dos estoques de TG, como substrato energético (PAN *et al.*, 1997), seria responsável pela diminuição da mobilização de glicose via glicogênio, levando a um *feedback* negativo do glicogênio muscular e hepático sobre a atividade da glicogênio-sintetase e, conseqüentemente, ao aumento do estoque de glicose. Além disso, outros estudos mostraram que em 8 semanas de alimentação rica em lipídios, houve redução da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4), tanto mediada pela insulina como pela contração muscular. Esta redução da translocação do GLUT-4 pode ser conseqüência de uma adaptação do metabolismo energético ao aumento de ácidos graxos livres no plasma e, conseqüentemente, do TG nos tecidos musculares, devido ao uso da dieta hiperlipídica (PEREIRA *et al.*, 2003).

Os animais DIO apresentaram a mesma quantidade de insulina secretada que C-S, sugerindo a presença de um mecanismo de compensação para manter a homeostase insulínica. Apesar disso, a glicemia, assim como a HbA1c desses animais, foram maiores em relação a C-S, evidenciando resistência à insulina. Dados recentes apontam a HbA1c como um marcador precoce para rastrear o risco de DM2 em populações de alto risco, como indivíduos com excesso de peso (EDELMAN *et al.*, 2004 ; LERNER *et al.*, 2014), permitindo que sejam realizadas intervenções para evitar o desenvolvimento do DM2. A intervenção farmacológica com a exenatida durante 20 dias nos animais DIO promoveu uma tendência para a diminuição da secreção do glucagon, reestabeleceu a glicemia e, conseqüentemente, também os níveis de HbA1c (iguais a C-S), sugerindo o aumento da sensibilidade desses animais à insulina, em relação a DIO sem tratamento.

Sabe-se que o Kitt, em função da supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, ocorre ao longo dos 15 primeiros minutos após a injeção de insulina no ITT (GELONESE e TAMBASCIA, 2006). No presente estudo, observamos uma segunda fase (a partir dos 30 minutos), onde se inicia uma resposta contra-regulatória para combater a hipoglicemia, na qual parecem envolvidos, não só a insulina, mas também outros hormônios como o glucagon, catecolaminas e hormônio de crescimento, que podem influenciar na diminuição da glicose (AHRÉN, 2000; GELONESE e TAMBASCIA, 2006; NERY, 2008). O tratamento dos animais DIO com a exenatida favoreceu a resposta contra-regulatória citada acima, visto que esses animais apresentaram aumento do Kitt, em relação a DIO sem tratamento. A melhora do controle glicêmico dos animais DIO-E, evidenciada no presente estudo pela diminuição da HbA1c e restauração da glicemia, assim como a possível influência da exenatida sobre o aumento da sensibilidade à insulina e nas respostas de hormônios (catecolaminas, cortisol, hormônio de crescimento, glucagon) são hipóteses prováveis para o favorecimento da resposta contra-regulatória observada.

Há forte associação entre ingestão excessiva de gorduras saturadas, elevação do colesterol sérico e aparecimento de doenças cardiovasculares (CARANTI *et al.*, 2007). Um dos mecanismos propostos para a ação deletéria dos ácidos graxos saturados é a redução no número de receptores hepáticos de LDL colesterol, o que pode inibir a remoção dessa lipoproteína e, também, aumentar os níveis de TG no plasma (CAPANNI *et al.*, 2006). Os animais DIO-E apresentaram diminuição do colesterol total e do VLDL, assim como de TG em relação ao DIO, não diferindo de C-S. Estudos evidenciaram que a hipertrigliceridemia é um fator de risco para doenças coronarianas, devido ao efeito aterogênico direto de lipoproteínas ricas em TG, principalmente o VLDL (SCHIAVO *et al.*, 2003). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem a eficácia da exenatida na melhora de dislipidemias e na prevenção de doenças coronarianas. O HDL e LDL colesterol foram similares entre todos os grupos. Sabe-se que embora a obesidade seja fator predisponente a vários tipos de dislipidemias, nem todos os obesos as apresentam, e mesmo indivíduos magros estão sujeitos a apresentá-las (DATTILO e KRIS-ETHERTON, 1992; HOWARD *et al.*, 2003). Portanto, cabe ressaltar que, em geral, os resultados observados no presente estudo são um bom indicativo dos efeitos benéficos da

exenatida sobre a obesidade dietética em ratos, num tratamento de 20 dias consecutivos, utilizando a dose farmacológica para humanos.

### 6.1.2 MSG

Hormônios circulantes que atuam sobre o SNC representam importantes sinais que refletem o *status* energético periférico e podem influenciar mecanismos centrais que regulam a ingestão de alimento e a MC (BOURET e SIMERLY, 2004). Dentre as áreas do SNC, o hipotálamo desempenha um papel crítico na regulação da alimentação (BOURET e SIMERLY, 2004). Sabe-se que aos 90 dias de idade, animais tratados com MSG no período neonatal, apresentam características marcantes como: obesidade visceral e subcutânea, aumento de insulina circulante, tanto no estado de jejum quanto no período pós-prandial, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia (SCOMPARIN *et al.*, 2006), reproduzindo características similares às aquelas observadas na síndrome metabólica em humanos (SCOMPARIN *et al.*, 2006).

O menor CNA, atribuído ao baixo nível do hormônio do crescimento, e o aumento no índice de Lee observados nos grupos MSG, em relação a C-S, são características deste modelo experimental (KUBOTA *et al.*, 1994), corroboradas no presente estudo e que não foram modificadas pela exenatida. A menor MC também é uma característica desse modelo. Entretanto, os animais MSG não apresentaram diferença na MC, em relação a C-S, a partir da 11ª semana.

Alguns autores constataram que animais MSG são normofágicos, característica também confirmada no presente estudo. Sabe-se que apesar da resistência a insulina, o modelo MSG ainda secreta insulina suficiente para manter a normoglicemia de jejum e evitar a instalação do DM2 (MORRISON *et al.*, 2008; SVIDNICKI *et al.*, 2013). Houve sutil aumento da glicemia e da secreção de insulina em MSG, em relação a C-S, porém não houve alteração da HbA1c. A redução da glicemia, durante o período de 20 dias de tratamento, em relação a MSG, juntamente com o aumento da secreção da insulina, em relação a C-S e MSG, evidencia a significativa atuação da exenatida na melhora do controle glicêmico, sugerindo a melhora da sensibilidade à insulina nesses animais. Apesar da secreção de glucagon não ter diferido significativamente entre os grupos C-S, MSG e MSG-E,

observou-se uma tendência de diminuição da secreção desse hormônio nos grupos MSG e MSG-E, principalmente neste último, talvez decorrente de contra-regulação entre a secreção de insulina e glucagon pelas ilhotas (NERY, 2008). Sabe-se que o GLP-1 apresenta a capacidade de restringir a secreção de glucagon nas ilhotas pancreáticas, sendo este considerado um importante mecanismo para regulação da concentração plasmática de glicose (NAUCK, *et al.* 2002). Segundo Nemeroff *et al.* (1977), a obesidade MSG é metabólica e não decorrente do aumento da ingestão alimentar. O presente estudo evidenciou que, no período de tratamento, os animais MSG-E têm um discreto aumento da ingestão de alimento em relação à MSG, sugerindo que isso ocorra para manter a homeostase glicêmica.

Os animais MSG e MSG-E apresentaram tolerância à glicose como C-S, dado este que está em concordância com a ausência de diferença no GTT entre animais MSG e controle com 13 semanas de idade e a presença de intolerância à glicose em animais MSG apenas entre 65 a 70 semanas de idade (MORRISON *et al.*, 2008). O tratamento com exenatida, assim como no DIO, aumentou o Kitt em relação aos animais MSG sem tratamento, mais uma vez sugerindo o favorecimento das respostas contra-regulatórias, por meio da ação benéfica da exenatida sobre o controle glicêmico e aumento da sensibilidade à insulina e da respostas de hormônios contra-reguladores.

O presente estudo mostrou que os depósitos de gordura periepídimal e retroperitoneal dos obesos MSG, tratados ou não com exenatida, apresentam maior massa e, juntamente com a análise do índice de Lee, evidenciam claramente outra característica desse modelo, que é a hipertrofia adipocitária (BERNARDIS e PATTERSON, 1968; MACHO *et al.*, 2000).

A hipertrigliceridemia e o maior nível de ácidos graxos livres no plasma também são relatados como características deste modelo de obesidade (CHIKAMORI *et al.*, 1977; DAWSON *et al.*, 1997; SCOMPARIN *et al.*, 2006). Nos resultados observados no presente estudo, corroborou-se a presença de hipertrigliceridemia e somente os níveis de HDL colesterol melhoraram, em relação a C-S, após o tratamento com exenatida. Utilizando NN2211, um composto derivado de GLP-1, na dose 200 µg/kg, duas vezes ao dia durante 10 dias consecutivos, Larsen *et al.* (2001) demonstraram acentuada perda de peso e redução de TG em animais MSG.

### 6.1.3 STZ

A indução de DM por STZ em roedores tem sido amplamente utilizada para estudos da fisiopatologia desta doença em humanos (DELFINO *et al.*, 2002; TAKADA *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2013). A indução durante a fase adulta produz um grave quadro de DM, resultando na necessidade da administração diária de insulina para garantir a sobrevivência do animal (TAKADA *et al.*, 2007). Quando a indução do DM com STZ ocorre na fase neonatal, o desenvolvimento da hiperglicemia, intolerância à glicose e leve hipoinsulinemia é um processo insidioso, quase assintomático no início, manifestando-se na idade adulta, com características que se assemelham ao curso natural do DM2 em humanos (KODAMA *et al.*, 1993). Uma hipótese para essa evolução é que, durante o período neonatal, não há destruição total das células beta, e daí, as células resistentes compensariam o dano causado pela STZ, aumentando a secreção de insulina para manter os níveis de glicose dentro da normalidade (AHRÉN, 1989). No entanto, depois de certo período, ocorre o esgotamento dessas células, resultando na diminuição de suas funções, conduzindo à elevação dos níveis plasmáticos de glicose (AHRÉN, 1989). A alta toxicidade da STZ dirigida para as células beta se deve a sua similaridade com a glicose, o que permite que STZ seja internalizada via GLUT2, o qual está presente em hepatócitos, células epiteliais intestinais e renais, e astrócitos de alguns núcleos do SNC (MACHADO, 1998).

Animais diabéticos apresentam perda de MC, hipoinsulinemia e hiperglicemia (LERCO *et al.*, 2003; DELFINO *et al.*, 2002), esta última a principal disfunção dessa doença (ATKINSON e EISENBARTH, 2001). Os elevados níveis de glicose circulantes no sangue acabam sendo eliminados pela urina, carregando consigo água em excesso (diurese osmótica). Esta eliminação de líquidos é compensada pelo aumento da ingestão de água (polidipsia) mediada por mecanismos que controlam a sede (CINTRA *et al.*, 2011). No presente estudo, observou-se polidipsia acentuada entre a 8ª e a 10ª semana, além do aumento da ingestão alimentar (polifagia). Os animais STZ apresentaram aumento da glicemia em relação a C-S e o tratamento com exenatida foi efetivo na redução, porém, não atingindo a normoglicemia. Na última semana do experimento, o grupo STZ apresentou menor

ganho de MC em relação a C-S. Sabe-se que no DM há dificuldade em captar e armazenar nutrientes em tecidos e órgãos e a perda destes pela urina causa redução da MC, fadiga e fome excessiva (polifagia) (CINTRA *et al.*, 2011), sendo que o tratamento com exenatida não alterou a MC e a ingestão de alimento.

Os animais STZ apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina em relação a C-S e STZ-E, quadro característico deste modelo (KONRAD *et al.*, 2001; WOLD *et al.*, 2003 TAKADA *et al.*, 2007) e que se confirma com os resultados de glicemia e HbA1c. O tratamento com exenatida restaurou a tolerância à glicose, e aumentou a sensibilidade à insulina evidenciando, também em nosso estudo, a sua já conhecida ação antidiabetogênica (KENDALL *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2009).

A massa dos tecidos adiposos periepídimal e retroperitoneal nos animais STZ foi menor em relação à C-S, o que provavelmente contribuiu com a redução de MC supracitada. Não foi constatada a dislipidemia, considerada, por outros autores, característica desse modelo experimental (HARDMAN, 1999; LERCO *et al.*, 2003; DELFINO *et al.*, 2002), nos diabéticos, tratados ou não com exenatida, em relação a C-S. Porém, a exenatida aumentou o HDL em STZ-E, sugerindo um papel benéfico desse fármaco na regulação dessa lipoproteína.

A HbA1c é um parâmetro importante no diagnóstico do DM2 (BEM e KUNDE, 2006; NETTO *et al.*, 2009). Houve aumento da HbA1c em STZ, como esperado, e o tratamento com exenatida diminuiu drasticamente os valores desse parâmetro equiparando-os ao de animais C-S, evidenciando assim o efeito benéfico deste fármaco em restabelecer a melhora do controle glicêmico.

A ação do GLP-1 estimulando o crescimento das células beta e a sua neogênese são clinicamente relevantes para o tratamento do DM (PERFETTI e MERKEL, 2000). A diminuição da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas isoladas foi evidenciada, após a incubação com glicose, em ambos os grupos diabéticos, STZ e STZ-E. A ausência da supressão apropriada da secreção das células alfa pelas células beta pancreáticas tem sido proposta como um mecanismo que explica as respostas exageradas do glucagon, especialmente prevalente em pacientes com deficiência de secreção das células beta (DM1 e em indivíduos com DM2 insulino-pênicos) (YOUNG, 2005). No entanto, no presente estudo a secreção de glucagon não diferiu entre os grupos.

## 6.2 Comparação das alterações, sob estudo, entre os modelos de obesidade MSG e DIO

A obesidade é o resultado de uma complexa interação de fatores genéticos; endócrinos, resultante do desequilíbrio dos hormônios anorexígenos e orexígenos, com consequências nos eventos catabólicos e anabólicos do indivíduo; culturais, devido ao aumento do consumo de dietas ricas em açúcares e gorduras amplamente disseminado pelos “fast-food”; e comportamentais com o crescimento do sedentarismo (CINTRA *et al.*, 2011).

No presente estudo, foram utilizados dois modelos de obesidade, a obesidade hipotalâmica e dietética. O modelo de obesidade hipotalâmica induzida por MSG reflete uma lesão que pode ser decorrente de algumas situações fisiopatológicas; em geral, sua incidência natural parece ocorrer tardiamente como consequência da obesidade (WILLIAMS, 2012; PURKAYASTHA e CAI, 2013). O modelo MSG permite a indução da obesidade provocando essa lesão em curto prazo, não sendo consequência das alterações ligadas à dieta, como ocorre no modelo de indução de obesidade dietética.

A hiperleptinemia, a hiperinsulinemia e a resistência à insulina são características desses dois modelos (EL-HASCHIMI *et al.*, 2000; MATYŠKOVÁ *et al.*, 2008). No presente estudo, as alterações observadas em MSG e DIO sugerem a presença de resistência à insulina, visto que ambos tiveram secreção de insulina maior (MSG) ou igual (DIO) ao C-S, porém a glicemia permaneceu maior que C-S em ambos os grupos. A obesidade e a provável resistência à insulina, somadas a outras anormalidades, como a hipertrigliceridemia e o aumento de VLDL, são características relacionadas àquilo que se definiu como risco cardiometabólico, o que aumenta a probabilidade desses indivíduos desenvolverem DM2.

Em suma, a comparação dos parâmetros morfométricos e metabólicos na Tabela 5, entre os grupos DIO e MSG, evidenciou maior comprometimento metabólico nos animais DIO. Esse resultado sugere que, além da idade do animal, a alimentação altamente calórica, a qual mimetiza a situação global de adesão a este tipo de dieta, compromete de modo mais contundente a homeostase energética.



### 6.3 Efeitos da exenatida na obesidade e DM

Os estudos com miméticos do GLP-1 para uso como terapia no DM2 vêm crescendo nos últimos anos. Sabe-se que pacientes diabéticos são propensos a doenças cardiovasculares e uma das principais razões que acarretam esse quadro é a dislipidemia diabética, caracterizada pelo aumento das concentrações de TG e LDL e diminuição do HDL, o qual está associado com hiperglicemia, assim como o aumento da resistência à insulina e de ácidos graxos livres que, por sua vez, também influenciam o quadro de dislipidemia diabética (FARR *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2014). Portanto, além de suas ações sobre a redução de MC e glicemia, melhorando a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose, o GLP-1 também pode regular o colesterol e TG (FARR *et al.*, 2014). Sabe-se que o tratamento agudo ou de longo prazo com GLP-1 ou seus análogos reduz os lipídios em situação de jejum, ou mesmo pós-prandialmente, em pacientes com DM2 (FARR *et al.*, 2014).

A sinalização do GLP-1 reduz a produção de VLDL e triglicerídeos no fígado, reduz o conteúdo hepático de TG pela modulação de enzimas-chave do metabolismo de lipídios neste órgão e prejudica a lipogênese *de novo* e a  $\beta$ -oxidação em hepatócitos. Além disso, o GLP-1 também é capaz de modular o transporte reverso de colesterol hepático (FARR *et al.*, 2014). Assim, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, a atuação da exenatida sobre o controle da dislipidemia, principalmente de animais com obesidade dietética, promovendo a melhora do quadro. Ainda, a exenatida reduziu a glicemia, a HbA1c, aumentou o Kitt e diminuiu a massa do tecido adiposo retroperitoneal, bem como a MC no modelo DIO. Na obesidade hipotalâmica, a exenatida aumentou a secreção de insulina e o Kitt, além de mostrar uma tendência para reduzir a secreção do glucagon, características que corroboram as ações do GLP-1 já descritas na literatura (DRUCKER e NAUCK, 2006; CECCARELLI *et al.*, 2013).

## 6.4 Sumário dos Resultados

- ❖ O grupo DIO caracteriza-se por alterações significativas nos parâmetros morfométricos (ganho de MC e CNA, aumento do índice de Lee, da massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e periepídidimo e da glicemia de jejum e diminuição da ingestão de alimentos, sensibilidade à insulina), metabólicos (aumento do TG, colesterol total, VLDL e HbA1c; não há alteração de HDL e LDL, proteína e osmolalidade plasmáticas e teores de insulina e glucagon secretados).
- ❖ O grupo MSG caracteriza-se por diminuição do ganho de CNA, aumento do índice de Lee, da massa de tecido adiposo retroperitoneal e periepídidimo e glicemia de jejum, diminuição da ingestão de alimento e líquido. Em relação aos parâmetros metabólicos, apresenta aumento dos níveis de TG, LDL e VLDL, e diminuição de proteínas plasmáticas e da sensibilidade à insulina, porém sem alterações no colesterol total, HbA1c, osmolalidade plasmática e teores de glucagon e insulina secretados.
- ❖ O grupo STZ caracteriza-se por menor ganho de MC, diminuição da massa dos tecidos adiposos periepídidimo e retroperitoneal. Em relação aos parâmetros metabólicos apresenta aumento do HDL e HbA1c, diminuição de insulina secretada, intolerância à glicose e insensibilidade à insulina em relação ao grupo C-S, bem como TG, colesterol total, LDL, VLDL, proteína e osmolalidade plasmática e teor de glucagon secretado inalterados.
- ❖ O grupo DIO caracteriza-se por maior comprometimento da homeostase energética, com aumento TG, VLDL, HbA1c, proteína plasmática e teor de insulina secretada, em relação ao grupo MSG. Ainda, devido à eficiência energética da alimentação, apresenta prejuízo nos seguintes parâmetros morfométricos: ganho de MC, ganho de CNA, ingestão alimentar e sensibilidade à insulina.

- ❖ O tratamento com exenatida por 20 dias consecutivos tem efeitos benéficos em parâmetros metabólicos e morfométricos relevantes nos grupos estudados (DIO, MSG e STZ), principalmente no DIO, onde diminui o ganho de MC, ingestão de alimento, massa do depósito de tecido adiposo retroperitoneal, glicemia de jejum, HbA1c, TG, VLDL, colesterol total e favorece a sensibilidade à insulina e mecanismos contra-regulatórios para o restabelecimento da glicemia. Também, melhora a glicemia de jejum e teor de insulina secretada, além de favorecer a sensibilidade à insulina e mecanismos contra-regulatórios para o restabelecimento da glicemia de MSG. Ainda, melhora a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose, glicemia de jejum e HbA1c de STZ, sem alterar a secreção de insulina e glucagon.

## **7. CONCLUSÕES**

O tratamento com exenatida, utilizando dose terapêutica para humanos, em um curto período de tempo reestabeleceu o controle glicêmico e a dislipidemia no modelo DIO e melhorou o controle glicêmico e aumentou o HDL no modelo MSG. O fato de que essa droga melhora o controle glicêmico em STZ foi corroborado. Esses dados contribuem com o conhecimento da farmacologia e fisiologia comparativa de componentes de venenos animais e para elucidar novos mecanismos relacionados à etiologia e desenvolvimento da obesidade, bem como para a prevenção e tratamento da obesidade e do DM.

## **8. PERSPECTIVAS**

Os achados do presente estudo revelam a necessidade de aprofundamento sobre vários aspectos relacionados aos mecanismos de atuação da exenatida, principalmente nos modelos de obesidade, tais como, avaliação do papel de sua sinalização na regulação de insulina, leptina e glucagon, bem como no controle da dislipidemia, e medida de insulina e glucagon no plasma, a fim de esclarecer como induzem a melhora do quadro metabólico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGHATE, E.; PONERY, A.S.; SHEEN, R. Streptozotocin-induced *diabetes mellitus* is associated with increased pancreatic tissue levels of noradrenaline and adrenaline in the rat. **Pancreas**, v.22, n.3, p. 311-316, 2001.

AHRÉN, B. Insulin secretion in neonatally streptozotocin-injected mice. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.11, n.4, p. 185-189, 1989.

AKAISHI, T.; HOMMA, S. Hypothalamic osmoregulation for vasopressin release in streptozotocin-diabetic rats in vivo and in vitro. **Brain Research**, v.589, n.8, p. 86-92, 1992.

ALPONTI, R.F.; SILVEIRA, P.F. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activities in plasma of monosodium glutamate obese and food-deprived rats. **Obesity**, v.18, n.7, p. 1312-1317, 2010.

AMARAL, M.E.C.; UENO, M.; OLIVEIRA, C.A.; BORSONELLO, N.C.; VANZELA, E.C.; RIBEIRO, R.A.; ALVES, P.L.; BARBOSA, H.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C. Reduced expression of SIRT1 is associated with diminished glucose-induced insulin secretion in islets from calorie-restricted rats. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v.22, n.6, p. 554-559, 2011.

ANDREAZZI, A.E.; SCOMPARIN, D.X.; MESQUITA, F.P.; BALBO, S.L.; GRAVENA, C.; DE OLIVEIRA, J.C.; RINALDI, W.; GARCIA, R.M.; GRASSIOLLI, S.; MATHIAS, P.C. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal Of Endocrinology**, v.201, n.3, p. 351-359, 2009.

ARAB, L.; SADEGHI, R.; WALKER, D.G.; LUE, L.F.; SABBAGH, M.N. Consequences of Aberrant Insulin Regulation in the Brain: Can Treating Diabetes be Effective for Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, v.9, n.4, p. 693-705, 2011.

ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. *Diabetes mellitus* and the  $\beta$  cell: the last ten years. **Cell**, v.148, n.6, p. 1160-1171, 2012.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, v.358, n.9277, p. 221-229, 2001.

AVENA, N.M.; RADA, P.; HOEBEL, B.G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.32, n.1, p. 20-39, 2008.

BAGNOL, D.; AL-SHAMMA, H.A.; BEHAN, D.B.; WHELAN, K.; GROTTICK A.J. Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v.9, n.9.38, p. 1-13, 2012.

BARTOLOMUCCI, A.; CABASSI, A.; GOVONI, P.; CERESINI, G.; CERO, C., BERRA, D.; DADOMO, H.; FRANCESCHINI, P.; DELL'OMO, G.; PARMIGIANI, S.; PALANZA, P. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. **PloS ONE**, v.4, n.1, p. 1-12, 2009.

BEM, A.F; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do *diabetes mellitus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.3, p. 185-191, 2006.

BENATTI, F.B.; JUNIOR, A.H.L. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.4, p. 263-269, 2007.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal Of Endocrinology**, v.40, n.4, p. 527-528, 1968.

BIOLIB. Disponível em: <http://www.biolib.cz/en/image/id40091/>. Acessado: 02/jul/2014.

BLOCH, B.; LING, N.; BENOIT, R.; WEHRENBURG, W.B.; GUILLEMIN, R. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. **Nature**, v.307, n.5948, p. 272-273, 1984.

BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; SENER, A.; MALAISSE, W.J.D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.73, n.1, p. 63-71, 1990.

BOURET, S.G ; SIMERLY, R.B. Minireview : Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. **Endocrinology**, v.145, n.6, p. 2621-2621, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p. 248-254, 1976.

BRAY, G.A.; INOUE, S.; NISHIZAWA, Y. Hypothalamic obesity. The autonomic hypothesis and the lateral hypothalamus. **Diabetologia**, v.20, p. 366-377, 1981.

BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assay for glycohemoglobin. **Clinical Chemistry**, v.47, n.2, p. 2153-2163, 2001.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C.E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal Of Molecular Endocrinology**, v.36, n.3, p. 485-501, 2006.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High fat diet: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, n.4, p. 798-808, 2007.

BUNYAN, J.; MURRELL, E.A.; SHANH, P.P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **British Journal of Nutrition**, v.36, n.1, p. 23-36, 1976.

BUSIAH, K.; VERKARRE, V.; CAVÉ, H; SCHARFMANN, R.; POLAK, M. Human pancreas endocrine cell populations and activating ABCC8 mutations. **Hormone Research in Paediatrics**, v.82, n.1, p. 59-64, 2014.

CAPANNI, M.; CALELLA, F.; BIAGINI, M.R.; GENISE, S.; RAIMONDI, L.; BEDOGNI, G.; SVEQLIATI-BARONI, G.; SOFI F.; MILANI, S.; ABBATE, R.; SURRENTI, C.; CASINI, A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.23, n.8, p. 1143-1151, 2006.

CARANTI, D.A.; DE MELLO, M.T.; PRADO, W.L.; TOCK, L.; SIQUEIRA, K.O.; DE PIANO, A.; LOFRANO, M.C, M.C.; CRISTOFALO, D.M.; LEDERMAN, H.; TUFIK, S.; DÂMASO A.R. Short-and long-term beneficial effects of a multidisciplinary therapy for the control of metabolic syndrome in obese adolescents. **Metabolism**, v.56, n.9, p. 1293-1300, 2007.



CARDINAL, J.W.; ALLAN, D.J.; CAMERON, D.P. Poly(ADP-ribose)polymerase activation determines strain sensitivity to streptozotocin-induced beta cell death in inbred mice. **Journal Of Molecular Endocrinology**, v.22, n.1 , p. 65-70, 1999.

CARVALHEIRA, J.B.; RIBEIRO, E.B; ARAÚJO, E.P.; GUIMARÃES, R.B.; TELLES, M.M.; TORSONI, M.; GONTIJO, J.A.; VELLOSO,L.A.; SAAD, M.J. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v.46 , n.12 , p. 1629-1640, 2003.

CECCARELLI, E.; GUARINO, E.G.; MERLOTTI, D.; PATTI, A.; GENNARI, L.; NUTI, R.;DOTTA, F. Beyond glycemic control in *diabetes mellitus*: effects of incretin-based therapies on bone metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, v.4 , n.73 , p. 1-12, 2013.

CESARETTI, M.L.R. ; JUNIOR, O.K. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.50 , n.2 , p. 190-197, 2006.

CHACRA, A.R. Efeito fisiológico das incretinas. **Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine**, v.6, n. 7b, p. S613-S617, 2006.

CHEN, Y., DRUCKER, D. Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin-4 in the lizard. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272 , n.7 , p. 4108-4115, 1997.

CHEN, S.; LIU, A.R.; AN, F.M.; YAO, W.B.; GAO, X.D. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. **Age**, v.34 , n.5 , p. 1211-1224, 2012.

CHIKAMORI, K.; MASUDA, K; ISUMI, H.; ISAKA, K; TEZUKA, U. Effect of vagotomy on hyperinsulinemia in obese rats with hypothalamic lesions. **Endocrinologia Japonica**, v.24 , n.3 , p. 251-258, 1977.

CHUFFA, L.G.; SEIVA, F.R. Combined effects of age and diet-induced obesity on biochemical parameters and cardiac energy metabolism in rats. **Indian Journal Biochemistry & Biophysics**, v.50 , n.1 , p. 40-47, 2013.

CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. **Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular**. 1. ed. São Paulo: Savier, 2011.

CLAUS, T.H.; PAN, C.Q.; BUXTON, J.M.; YANG, L.; REYNOLDS, J.C; BARUCCI, N.; BURNS, M.; ORTIZ, A.A.; ROCZNIAK, S.; LIVINGSTON, J.N.; CLAIRMONT, K.B.; WHELAN, J.P. Dual-acting peptide with prolonged glucagon-like peptide-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist activity for the treatment of type 2 diabetes. **Journal Of Endocrinology**, v.192 , n.2 , p. 371-380, 2007.

COPPS, K.D.; WHITE, M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, v. 55, p. 2565-2582, 2012.

CORTEZ, M.; CARMO, L.S.; ROGERO, M.M.; BORELLI, P.; FOCK, R.A. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  production by increasing NF- $\kappa$ B and attenuating PPAR- $\gamma$  expression in bone marrow mesenchymal stem cells. **Inflammation**, v.36 , n.2 , p. 379-386, 2013.

DATTILO, A.M.; KRIS-ETHERTON, P.M. Effects of weight reduction on blood lipids, and lipoproteins: a meta analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.56 , n.2 , p. 320-328, 2013.

DAWSON, R.; PELLEYMOUNTER, M.A.; MILLARD, W.J.; LIU, S.; EPPLER, B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.273, n.1 Pt 1, p. E202-E206, 1997.

DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of the long-term complications in insulin-dependent *diabetes mellitus*. **The New England Journal of Medicine**, v.329, n.14, p. 977-986, 1993.

DEFRONZO, R.A.; RATNER, R.; HAN, J.; KIM, D.D.; FINEMAN, M.S. ; BARON, A.D. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.28, n.5, p. 1092-1100, 2005.

DELFINO, V.D.A. ; FIGUEIREDO, J.F. ; MATSUO, T. ; FAVERO, M.E. MATNI, A.M. ; MOCELIN, A.J. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina : comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.24, n.1, p. 31-36, 2002.

DIETRICH, M.O.; MULLER A, BOLOS M, CARRO E, PERRY ML, PORTELA LV, SOUZA DO, TORRES-ALEMAN I. Western style diet impairs entrance of blood-

borne insulin-like growth factor-1 into the brain. **NeuroMolecular Medicine**, v.9, n.4, p. 324-330, 2007.

DOLNIKOFF, M.; MARTÍN-HIDALGO A, MACHADO UF, LIMA FB, HERRERA E. . Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **Internacional Journal of Obesity**, v.25, n.3, p. 426-433, 2001.

DOYLE, M.E.; EGAN, J.M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, n.3, p. 546-593, 2007.

DRUCKER, D.J. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. **Molecular Endocrinology**, v.17, n.2, p. 161-171, 2003.

DRUCKER, D.J.; NAUCK, M.A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **The Lancet**, v.368, n.9548, p. 1696-1705, 2003.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENE-FIORESE, M.; DÂMASO, A.R.; CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.3, p. 341-348, 2006.

EDELMAN, D.; OLSEN, M.K.; DUDLEY, T.K.; HARRIS, A.C.; ODDONE, E.Z. Utility of hemoglobin A1c in predicting diabetes risk. **Journal of General Internal Medicine**, v.19, n.12, p. 1175-1180, 2004.

ESTADELLA, D.; OYAMA LM, DÂMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p. 218-224, 2004.

FARR, S.; TAHER, J.; ADELI, K. Glucagon-Like Peptide-1 as a Key Regulator of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Fasting and Postprandial States. **Cardiovascular & Hematological Disorders - Drug Targets**, v.14, n.2, p. 126-136, 2014.

FERREIRA, D.S.; AMARAL, F.G.; MESQUITA, C.C.; BARBOSA, A.P.L.; LELLIS-SANTOS, C.; TURATI, A.O.; SANTOS, L.R.; SOLLON, C.S.; GOMES, P.R.; FARIA, J.A.; CIPOLLA-NETO, J.; BORDIN, S.; ANHE, G.F. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **Plos One**, v.7, n.6, p. 1-10, 2012.

FLAMEZ, D.; VAN BREUSEGEM A, SCROCCHI LA, QUARTIER E, PIPELEERS D, DRUCKER DJ, SCHUIT F. Mouse pancreatic beta-cells exhibit preserved glucose competence after disruption of the glucagon-like peptide-1 receptor gene. **Diabetes**, v.47, n.4, p. 646-652, 1998.

FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S.F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M.K.; HODGSON, W.C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v.439, n.7076, p. 584-588, 2006.

GELONESE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.2, p. 208-215, 2006.

GEROZISSIS, K. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. **European Journal of Pharmacology**, v.585, n.1, p. 38-49, 2008.

GINSBERG, H.N.; MACCALLUM, P.R. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 *diabetes mellitus* pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 *diabetes mellitus*. **Journal of The CardioMetabolic Syndrome**, v.4, n.2, p. 113-119, 2009.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; LEONARDINI, A.; NATALICCHIO, A. GLP-1: a new approach for type 2 diabetes therapy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.74, Suppl.2, p. S152-S155, 2006.

GORRELL, M.D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clinical Science**, v.108, n.4, p. 277-292, 2005.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHEL, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p. 16-26, 2002.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p.T1-T23, 2014.

GRUNDY, S.M.; BENJAMIN, I.J.; BURKE, G.L. *Diabetes mellitus* and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart association. **Circulation**, v.100, n.10, p. 11346-1146, 1999.

HALPERN, A.; MANCINI, M.C. Tratamento farmacológico da obesidade: drogas termogênicas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.40, n.4, p. 224-227, 1996.

HARDMAN, A.E. Physical activity, obesity and blood lipids. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.23, Suppl.3, p. S64-S71, 1999.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v.23, n.2, p. 270-299, 2010.

HAYES, M.R. ; KANOSKI SE, ALHADEFF AL, GRILL HJ. Comparative effects of the long-acting GLP-1 receptor ligands, liraglutide and exendin-4, on food intake and body weight suppression in rats. **Obesity**, v.19, n.7, p. 1342-1349, 2011.

HERR, R.R.; JAHNKE JK, ARGOUEDELIS AD. The structure of streptozotocin. **Journal of the American Chemical Society**, v.89, n.18, p. 4808-4809, 1967.

HILL, J .O.; PETERS JC, LIN D, YAKUBU F, GREENE H, SWIFT L. Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.17, n.4, p. 223-236, 1993.

HIMAYA, A. FANTINO M, ANTOINE JM, BRONDEL L, LOUIS-SYLVESTRE J. Satiety power of dietary fat: a new appraisal. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, n.5, p. 1410-1418, 1997.

HOWARD, B.V.; RUOTOLO, G.; ROBBINS, D.C. Obesity and dyslipidemis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.32, n.4, p. 855-867, 2003.

HOWARD, J.K. FLIER, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.17, n.9, p. 365-371, 2006.

HOSHINO, M.; HONG YM, KISHIDA S, KATSUMARU Y, VANDERMEERS A, VANDERMEERS-PIRET MC, ROBBERECHT P, CHRISTOPHE J, YANAIHARA N.

Primary structure of helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. **FEBS Letters**, v.178, n.2, p. 233-239, 1984.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF) 2005. Disponível em <[www.idf.org/home/index.cfm?node=1429](http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429)> Acessado em 25/ago/2010.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF) 2005. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acessado em 25/ago/2010.

KAHN, S.E.; BEARD, J.C.; SCHWARTZ, M.W.; WARD, W.K.; DING, H.L.; BERGMAN, R.N.; TABORSKY, G.J.Jr.; PORTE, D. Jr. Increased beta-cell secretory capacity as mechanism for islet adaptation to nicotinic acid-induced insulina resistance. **Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 562-568, 1989.

KASAKO, K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.98, Suppl.1, p. S32-S36, 2011.

KAUFHOLD, A.; NIGAM PK, DHIR RN, SHAPIRO BH. Prevention of latently expressed CYP2C11, CYP3A2, and growth hormone defects in neonatally monosodium glutamate-treated male rats by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine maleate. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, n.2, p. 490-496, 2002.

KENDALL, D.M.; CUDDIHY RM, BERGENSTAL RM. Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use. **The American Journal of Medicine**, v.122, n.6, p. S37-S50, 2009.

KIM, M.K.; CHO, J.H; LEE, J.J.; CHEONG, Y.H.; SON, M.H.; LEE, K.J. Differential protective effects of exenatide, an agonist of GLP-1 receptor and piragliatin, a glucokinase activador in beta cell response to streptozotocin-induced and endoplasmic reticulum stresses. **PLoS ONE**, v.8, n.9, p. e73340, 2013.

KLOP, B.; ELTE, J.W.; CABEZAS, M.C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v.5, n.4, p. 1218-1240, 2013.

KODAMA, T. ; IWASE, M.; NUNOI, K.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.20, n.3, p. 183-189, 1993.

KONRAD, R.J.; MIKOLAENKO I, TOLAR JF, LIU K, KUDLOW JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v.356, n.1, p. 31-41, 2001.

KUBOTA, A. ; NAGAKAWA, Y. ; IGARASHI, Y. Studies of gene expression in liver of insulina-like growth factor (IGF-1), IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. **Hormone and Metabolic Research**, v.26, n.11, p. 497-503, 1994.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, n.1, p. 35-39, 1967.

LARSEN, P.J.; FLEDELIUS, C.; KNUDSEN, L.B.;TANG-CHRISTENSEN, M. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivate NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. **Diabetes**, v.50, n.11, p. 2530-2539, 2001.

LEE, M.O. Determination of the surface area of the white rat with its application to expression of metabolic results. **American Journal of Physiology**, v.89, p. 24-33, 1929.

LEE, J.; MIYAZAKI, M.; ROMEO, G.R.; SHOELSON, S.E. Insulin receptor activation with transmembrane domains ligands. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 28, p. 19769-19777, 2014.

LEHNEN, A.M.;LEGUISAMO, N.M.;PINTO G.H.; MARKOSKI, M.M.;ANGELIS, K.; MACHADO, U.F.; SCHAAN, B. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovascular Diabetology**, v.9, n.67, p. 1-8, 2010.

LEIGH, F.S.; KAUFMAN LN, YOUNG JB. Diminished epinephrine excretion in genetically obese (ob/ob) mice and monosodium glutamate-treated rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.16, n.8, p. 597-604, 1992.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *diabetes mellitus* induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p. 132-142, 2003.

LERNER, N.; SHANI, M.; VINKER, S. Predicting type 2 *diabetes mellitus* using haemoglobin A1c: a community-based historic cohort study. **European Journal of General Practice**, v.20, n.2, p. 100-106, 2014.

LESTER-COLL, N.; RIVERA EJ, SOSCIA SJ, DOIRON K, WANDS JR, DE LA MONTE SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.9, n.1, p. 13-33, 2006.

LIANG, N.C.; BELLO, N.T.; MORAN, T.H. Additive feeding inhibitory and aversive effects of naltrexone and exendin-4 combinations. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.37, n.2, p. 272-278, 2013.

LIBBY, P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. **The American Journal of Cardiology**, v.88, n.12, p. 3N-8N, 2001.

LINDQVIST, A.; BAELEMANS A, ERLANSON-ALBERTSSON C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. **Regulatory Peptides**, v.150, n.1-3, p. 26-32, 2008.

LLADÓ, I.; PICÓ C, PALOU A, PONS A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. **Physiology & Behavior**, v.58, n.3, p. 513-519, 1995.  
LOTTENBERG, A.M.P. Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p. 595-607, 2009.

MACHADO, U.F. Transportadores de glicose. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.42, n.6, p. 413-421, 1998.

MACHO, L.; FICKOVA M, ZORAD S, SEBOKOVA E, KLIMES I. Effects of new hypoglycemic agent A-4166 on lipolysis and lipogenesis in rat adipocytes. **Endocrine Regulations**, v.34, n.3, p. 119-126, 2000.

MATYŠKOVÁ, R.; MALETÍNSKÁ, L.; MAIXNEROVÁ, J.; PIRNÍK, Z.; KISS, A.; ZELEZNÁ, B. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice. **Physiology & Behavior**, v.57, n.5, p. 727-734, 2008.

MARTÍN, F.J.; MÍGUEZ, J.M.; ALDEGUNDE, M.; ATIENZA, G. Effect of streptozotocin-induced *diabetes mellitus* on serotonin measures of peripheral tissues in rats. **Life Sciences**, v.56, n.1, p. 51-59, 1995.



MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Ed. Guanabara Koogan 3ªed. 2010, Rio de Janeiro.

MCQUEEN, R.B.; ELLIS, S.L.; MAAHS, D.M.; ANDERSON, H.D.; NAIR, K.V.; LIBBY, A.M.; CAMPBELL, J.D. Association between glycated hemoglobin and health utility for type 1 diabetes. **The Patient - Patient-Centered Outcomes Research**, v.7, n.2, p. 197-205, 2014.

MÉIER, J.J.; GALLWITZ B, SCHMIDT WE, NAUCK MA. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v.440, n.2-3, p. 269-279, 2002.

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

MURTHY, S.N.; HILAIRE RC, CASEY DB, BADEJO AM, MCGEE J, MCNAMARA DB, KADOWITZ PJ, FONSECA VA. The synthetic GLP-I receptor agonist, exenatide, reduces intimal hyperplasia in insulin resistant rats. **Diabetes & Vascular Disease Research**, v.7, n.2, p. 138-144, 2010.

NAKAGAWA, T.; UKAI K, OHYAMA T, GOMITA Y, OKAMURA H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. **Experimental Animals**, v.49, n.4, p. 239-249, 2000.

NAKAYA, N. Hypertriglyceridemia as a cause of atherosclerosis. **Nippon Rinsho**, v.60, n.5, p. 860-867, 2002.

NASCIMENTO, A.F.; SUGIZAKI, M.M.; LEOPOLDO, A.S. ; LIMA-LEOPOLDO, A.P. ; LUVIZOTTO, R.A. ; NOGUEIRA, C.R. ; CICOONA, A.C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.6, p. 968-974, 2008.

NATOCHIN, I.; SHESTAKOVA, M.V.; KUZNETSOVA, A.A.; KLEFORTOVA, I.I.; TRUBITSYNA, N.P.; DEDOV, I.I. *Diabetes mellitus*: renal osmoregulating function. **Ter Arkh**, v.82, n.6, p. 9-14, 2012.

NAUCK, M.A.; HEIMESAAT, M.M.; BEHLE, K.; HOLST, J.J.; NAUCK, M.S.; RITZEL, R.; HÜFNER, M.; SCHMIEGEL, W.H. Effects of glucagon-like peptide 1 on counter regulatory hormone responses, cognitive functions and insulin secretion during hyperinsulinaemic stepped hypoglycaemic clamp experiments in healthy volunteers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.3, p. 1239-1246, 2002.

NEMEROFF, C.B.; KONKOL, R.J.; BISSETTE, G.; YOUNGBLOOD, W.; MARTIN, J.B.; BRAZEAU, P.; RONE, M.S.; PRANGE, A.J. JR.; BREESE, G.R.; KIZER, J.S. Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG): evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation. **Endocrinology**, v.101, n.2, p. 613-622, 1977.

NEMEROFF, C.B.; LIPTON, M.A.; KIZER, J.S. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. **Developmental Neuroscience**, v.1, n.2, p. 102-109, 1978.

NERY, M. Hipoglicemia como fator complicador no tratamento do diabetes melito tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.2, p. 288-298, 2008.

NETTO, A.P.; ANDRIOLO, A.; FILHO, F.F.; TAMBASCIA, M.; GOMES, M.B.; MELO, M.; SUMITA, N.M.; LYRA, R.; CAVALCANTI, S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.1, p. 31-48, 2009.

NISHIMURA, C.; KURIYAMA, K. Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats: effect of vitamin A administration. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.37, n.4, p. 365-372, 1985.

NISWENDER, K. ; BASKIN DG, SCHWARTZ MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.15, n.8, p. 362-369, 2004.

NISWENDER, K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction - a complex interplay. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.12, n.4, p. 267-287, 2010.

PAGLIASSOTTI, M.J.; GAYLES, E.C.; PODOLIN, D.A.; WEI, Y.; MORIN, C.L. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. **American Journal of Physiology**, v.278, n.1, p. 66-73, 2000.

PAINTER, N.A.; MORELLO, C.M.; SINGH, R.F.; MCBANE, S.E. An Evidence-Based and Practical Approach to Using Bydureon in Patients With Type 2 Diabetes. **Journal of the American board of Family Medicine**, v.26, n.2, p. 203-210, 2013.

PARKER, D.S.; RAUFMAN, J.P.; O'DONOHUE, T.L.; BLEDSOE, M.; YOSHIDA, H.; PISANO, J.J. Amino acid sequences of helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.19, p. 11751-11755, 1984.

PAN, D.D.; LILLIOJA, S.; KRIKETOS, A.D.; MILNER, M.R.; BAUR, L.A.; BOGARDUS, C.; JENKINS, A.B.; STORLIEN, L.H. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. **Diabetes**, v.46, n.6, p. 983-988, 1997.

PATEL, V.J.; JOHARAPURKAR, A.A.; SHAH, G.B.; JAIN, M.R. Effect of GLP-1 based therapies on diabetic dyslipidemia. **Current Diabetes Reviews**, v.10, n.4, p. 238-250, 2014.

PATTI, M.E.; KAHN, C.R. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v.9, p. 89-109, 1998.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; JR, A.H.L. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.47, n.2, p. 111-127, 2003.

PERELLO, M.; MORENO, G.; GAILLARD, R.C.; SPINEDI, E. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. **Neuroendocrinology Letters**, v.25, n.1-2, p. 119-126, 2004.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Editora Guanabara Koogan, p.78-82, 2005.

PERFETTI, R.; MERKEL, P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic b-cell function. **European Journal Endocrinology**, v.143, n.6, p. 717-725, 2000.

PESCE, G.; GUILLAUME V, DUTOUR A, DADOUN F, JOANNY P, STEINBERG J, OLIVER C. Effect of streptozotocin-induced diabetes on somatostatin receptors in the anterior pituitary, hypothalamus and cerebral cortex of the male rat. **Life Science**, v.54, n.24, p. 1927-1933, 1994.

PIRO, S.; MASCALI, L.G.; URBANO, F.; FILIPPELLO, A.; MALAGUARNERA, R.; CALANNA, S.; RABUAZZO, A.M.; PURRELLO, F. Chronic Exposure to GLP-1 Increases GLP-1 Synthesis and Release in a Pancreatic Alpha Cell Line (a-TC1): Evidence of a Direct Effect of GLP-1 on Pancreatic Alpha Cells. **PLOS One**, v. 9, n. 2, p. 1-14, 2014.

PROTEÍNAS. Disponível em: <http://asproteinas.com/proteina-total>. Acessado: 03/jul/2014.

PURKAYASTHA, S.; CAI, D. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. **Molecular Metabolism**, v.2, n.4, p. 356-363, 2013.

QADER, S.S.; HÅKANSON, R.; REHFELD, J.F.; LUNDQUIST, I.; SALEHI, A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. **Regulatory Peptides**, v.146, n.1-3, p. 230-237, 2008.

RAUFMAN, J.P.; JENSEN, R.T.; SUTLIFF, V.E.; PISANO, J.J.; GARDNER, J.D. Actions of Gila monster venom on dispersed acini from guinea pig pancreas. **American Journal of Physiology**, v.242, n.5, p. G470-G474, 1982.

ROMANA-SOUZA, B.; SANTOS, J.S.; DESMOULIÈRE, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Beta-adrenoceptor blockade delays granulation tissue formation in polyurethane sponge implants. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.36, n.5, p. 522-528, 2009.

RUSSEL, F.E.; BOGERT, C.M. Gila monster: its biology, venom and bite -- a review. **Toxicon**, v.19, n.3, p. 341-359, 1981.

SALMENKALLIO-MARTTILA, M; DUE, A.; GUNNARSDOTTIR, I.;KARHUNEN, L.; SAARELA, M.; LYLTY, M. **Satiety weight management and foods: Literature review**. Nordic Innovation Centre, 2009.

SCALLET, A.C.; OLNEY, J.W. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain Research**, v.374, n.2, p. 380-384, 1986.

SCOMPARIN, D.X.; GRASSIOLLI, S.; MARÇAL, A.C.; GRAVENA, C.; ANDREAZZI, A.E.; MATHIAS, P.C. Swin training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. **Life Science**, v.79, n.22, p. 2151-2156, 2006.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p. 283-288, 2003.

SERESS, L. Divergent effects of acute and chronic monosodium L-glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. **Neuroscience**, v.7, n.9, p. 2207-2216, 1982.

SHAPIRO, B.N.; ALBUCHER, R.C.; MACLEOD, J.N.; BITAR, M.S. Normal levels of hepatic drug-metabolizing enzymes in neonatally induced, growth hormone-deficient adult male and female rats. **Drug Metabolism & Disposition**, v.14, n.5, p. 585-589, 1986.

SHELLEY, E.; KEATING, G.M. **Lixisenatide: First Global Approval. R&D.** Insight Report, 2013.

SHILLABEER, G.; LAU, D.C.W. Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. **The Journal of Lipid Research**, v.35, n.4, p. 592-600, 1994.

SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KRÓL, E. The contribution of animal models to the study of obesity. **Laboratory Animals**, v.42, n.4, p. 413-432, 2008.

STEEN, E.; TERRY B.M.; RIVERA, E.J.; CANNON, J.L.; NEELY, T.R.; TAVARES, R.; Xu, X.J.; WANDS, J.R.; DE LA MONTE, S.M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.7, n.1, p. 63-80, 2005. 2005; 7: 63-80.

STEIN, D.T.; STEVENSON, B.E.; CHESTER, M.W.; BASIT, M.; DANIELS, M.B.; TURLEY, S.D. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. **The Journal Clinical Investigation**, v.100, n.2, p. 398-403, 1997.

STRAUSS, A.; MOSKALENKO, V.; CHODNEVSKAJA, I.; TIMM, S.; THIEDE, A.; OTTO, C.; ULRICHS, K. Exendin-4 improves the oral glucose tolerance in diabetic rats: pancreas regeneration, better function of pancreatic islets, or impaired glucose uptake?. **Transplantation Proceedings**, v.40, n.2, p. 533-535, 2008.

STUBBS, R.J.; WHYBROW, S. Energy density, diet composition and palatability: influences on overall food energy intake in humans. **Physiology & Behavior**, v.81, n.5, p. 755-764, 2004. 2004; 81:755-764.

SVIDNICKI, P.V. ; LEITE, N.C.; VENTURELLI, R.L.C.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; NOGAROTO, V.; GRASSIOLLI, S. Swin training restores glucagon-like peptide-1 insulintropic action in pancreatic islets from monosodium glutamate-obese rats. **Acta Physiologica**, v.209, n.1, p. 34-44, 2013.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat.Characteristics of the experimental model. **Experimental Biology and Medicine**, v.237, n.5, p. 481-490, 2012.

TAKADA, J.; MACHADO, M.A.; PERES, S.B.; BRITO, L.C.; BORGES-SILVA, C.N.; COSTA, C.E.M.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S. ; LIMA, F.B. Neonatal streptozotocin-induced *diabetes mellitus* : a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, v.56, n.7, p. 977-984, 2007.

TAKAHASHI, S.; OSAWA, T. Decreased proliferation of pituitary cells of streptozotocin-induced diabetic rats in response to estradiol-17-beta. **Acta Anatomica (Basel)**, v.151, n.4, p. 239-244, 1994.

TRAPP, S.; RICHARDS, J.E. The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant?. **Current Opinion Pharmacology**, v.3, n.6, p. 964-969, 2013.

UIRLCH, P.; CERAML, A. Protein glucation, diabetes and aging. **Recent Progress in Hormone Research**, v.56, p. 1-22, 2001.

USTA, M.F.; BIVALACQUA, T.J.; YANG, D.Y.; RAMANITHARAN, A.; SELL, D.R.; VISWANATHAN, A.; MONNIER, V.M.; HELLSTROM, W.J. The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin diabetic rats. **The Journal of Urology**, v.170, n. 3, p.1437-1442, 2001.

VAN DIJK, G.; THIELE, T.E. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress. **Neuropeptides**, v.33, n. 5, p.406-414, 1999.

WAN, C.K.N.; GIACCA, A.; MATSUHISA, M.; EL-BAHRANI, B.; LAM, L.; RODGERS, C.; SHI, Z.Q. Increased responses of glucagon and glucose production to hypoglycemia with intraperitoneal versus subcutaneous insulin treatment. **Metabolism**, v.49, n. 8, p.984-989, 2000.

WEST, D.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n. 3, p.505S-512S, 1998.

WHITE, P.A.S.; CERCATO LM, ARAÚJO JM, SOUZA LA, SOARES AF, BARBOSA AP, NETO JM, MARÇAL AC, MACHADO UF, CAMARGO EA, SANTOS MR, BRITO LC. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.57, n. 5, p.339-345, 2013.

WILLIAMS, .LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.71, n. 4, p.521-533, 2012.

WILSON, G.L.;HARTIG, P.C.;PATTON, N.N.; LEDOUX, S.P. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. **Diabetes**, v.37, n.2, p.213-216, 1988.

WOLD, L.E.; MURALIKRISHNAN, D.; ALBANO, C.B.; NORBY, F.L.; EBADI, M.; REN, J. Insulin-like growth factor I (IGF-1) supplementation prevents diabetes-induced alterations in coenzymes Q9 and Q10. **Acta Diabetologica**, v.40, n.2, p.85-90, 2003.

World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em 23/04/2015.

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

WYNNE, K.; STANLEY. S.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v.184, n.2, p.291-318, 2005.

WU, L.; OLVERLING, A.; HUANG, Z.; JANSSON, L.; CHAO, H.; GAO, X.; SJÖHOLM, Å. GLP-1, exendin-4 and C-peptide regulate pancreatic islet microcirculation, insulin secretion and glucose tolerance in rats. **Clinical Science**, v.122, n.8, p.375-384, 2012.

YOUNG, A. Inhibition of glucagon secretion. **Advances in Pharmacology**, v.52, p.151-171, 2005.

YUONG, G.S.; KIRKLAND, J.B. Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v.32, n.2, p.161-176, 2007.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S.C.; VILLARROEL, J.S.; ALPONTI, R.F.; SILVEIRA, P.F. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Research**, v.1170, p.112-118, 2007a.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI SC, VILLARROEL JS, MURENA-NUNES C, SILVEIRA PF. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Peptides**, v.28, n.8, p.1586-1595, 2007b.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S.C.; VILLARROEL, J.S.; ALPONTI, R.F.; SILVEIRA, P.F. Prospective evaluation of aminopeptidase activities in plasma and peripheral organs of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Endocrinology Investigation**, v.31, n.6, p.492-498, 2008.

ZHANG, Y; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, n.6505, p.425-432, 1994.

ZHAO, W.Q.; CHEN, H.; QUON, M.J.; ALKON, D.L. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. **European Journal of Pharmacology**, v.490, n.1-3, p.71-81, 2004.

ZHAO, Q.; MATSUMOTO K.; TSUNEYAMA, K.; TANAKA, K.; LI, F.; SHIBAHARA, N.; MIYATA, T.; YOKOZAWA, T. Diabetes-Induced Central Cholinergic Neuronal Loss and Cognitive Deficit Are Attenuated by Tacrine and a Chinese Herbal Prescription, Kangen-Karyu: Elucidation in Type 2 Diabetes db/db Mice. **Journal of Pharmacological Science**, v.117, n.4, p.230-242, 2011.



ZHENG, H.; WHITMAN, S.A.; WU, W.; WONDRAK, G.T.; WONG, P.K.; FANG, D.; ZHANG, D.D. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.60, n.11, p.3055-3066, 2011.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 4, p.574-589, 2004.