

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E  
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**ANA CLAUDIA VALCANAIA**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR SOBRE O  
CONTROLE SECRETOR DE INSULINA EM ILHOTAS  
PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS OBESOS**

CASCAVEL-PR  
(Março/2018)

**ANA CLAUDIA VALCANAIA**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR SOBRE O  
CONTROLE SECRETOR DE INSULINA EM ILHOTAS  
PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Dr<sup>a</sup> Sabrina Grassioli

CASCAVEL-PR  
(Março/2018)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Valcanais, Ana Claudia  
Efeitos do exercício físico regular sobre o controle secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos obesos / Ana Claudia Valcanais; orientador(a), Sabrina Grassioli, 2018.  
90 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Graduação em Farmácia Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2018.

1. Obesidade. 2. Exercício Físico. 3. Secreção de insulina. I. Grassioli, Sabrina . II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLAUDIA VALCANAIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR SOBRE O  
CONTROLE SECRETOR DE INSULINA EM ILHOTAS  
PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS OBESOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Sabrina Grassioli  
UNIOESTE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sandra Lucinei Balbo  
UNIOESTE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias  
UEM

CASCADEL-PR  
(Março/2018)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação aos meus pais, Mauro e Cleuzi, por sempre colocarem meus interesses antes dos seus e serem minha fortaleza em todos os momentos de minha vida. Eu amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força concedida a mim para enfrentar todos os percalços que surgiram nesses dois anos.

Agradeço aos meus pais, Mauro e Cleuzi, por todo o amor e carinho concedido em minha vida e, especialmente neste momento, por toda força e apoio que me concederam quando decidi enfrentar mais esse desafio em minha vida. Amo vocês infinitamente!

Agradeço ao meu esposo, pelo entendimento e pela paciência, afinal, foram dois anos de muitas mudanças, inclusive com a realização do nosso casamento. Sei que foram muitos momentos onde a atenção foi voltada aos estudos, mas saiba que seu apoio foi sempre fundamental. Amo você!

Agradeço aos meus irmãos, Renata e Mauro, pelos conselhos, auxílios e caronas nesses anos. Não sei o que seria de mim sem o apoio que me deram. Amo muito vocês meus maninhos!

Agradeço a minha princesa Maria Fernanda, pelo olhar que me conforta e pelo abraço que me reconstrói! Saiba que mesmo você não entendendo, sua presença sempre me mostrou o quanto a vida é linda e o quanto o amor é fundamental para enfrentar qualquer momento ruim. A titia ama você, princesa!

Agradeço a minha avó, aos meus cunhados e sogros, assim como meus tios e primos que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim em todos os momentos. Amo vocês!

Ao meu braço direito durante o mestrado, minha amiga e companheira em todos os momentos, Zoé. Saiba que você foi fundamental em todos os momentos, seja nas conversas, nos auxílios na escrita, nas apresentações, nas estatísticas, nos experimentos e no cuidado com nossos animais. Você se tornou alguém muito especial para mim e não teria conseguido sem ti. Amo você!

As minhas queridas do laboratório: Vanessa, Carol, Jake e Sandra por todo o auxílio; assim como todos aqueles alunos da graduação que me auxiliaram tanto nos experimentos. Sem vocês nada teria sido possível.

Agradeço a Tarliza e a Carine por todo o auxílio nos experimentos moleculares. Vocês foram anjos que Deus colocou em meu caminho. Muito obrigada!

Agradeço imensamente a minha orientadora Sabrina Grassioli pela confiança,

pelo conhecimento e por todo auxílio durante esses dois anos. Grata surpresa da vida! Saiba que te admiro muito como pessoa e como mestre. Você é genial!

Agradeço por todo o auxílio das Professoras companheiras de laboratório: Sandra, Maria Lúcia e Sara; não auxílio apenas material, mas também pelo conhecimento transmitido em cada conversa.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro da CAPES, pela bolsa auxílio concedida e pelo financiamento necessário para a pesquisa.

Muito obrigada!

## RESUMO GERAL

O desequilíbrio da homeostase energética resulta em obesidade, associada ao desenvolvimento da Resistência à Insulina e hiperinsulinemia. A secreção de insulina é estimulada pela glicose e modulada por sinais neurais autonômicos. A secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) é um processo que acopla metabolismo-oxidativo, alteração do potencial de membrana, resultando em influxo de cálcio e exocitose dos grânulos de insulina pelas células beta ( $\beta$ ) pancreáticas. A Acetilcolina (ACH) liberada pelos terminais neurais do nervo vago, ramo parassimpático, ao ligar-se a receptores muscarínicos subtipo 3 (MR3) localizados nas células  $\beta$  pancreáticas, atua como importante potencializador da SIIG. Hiperatividade vagal e alterada sensibilidade à glicose e ACH, parecem contribuir para a hipersecreção de insulina e disfunções da célula  $\beta$  pancreática em indivíduos obesos. Apesar de ser bem reconhecido que o exercício físico reduz o tecido adiposo e a hiperinsulinemia, seus efeitos diretos sobre o controle da SIIG e da modulação colinérgica em ilhotas pancreáticas não estão completamente esclarecidos. Deste modo, a questão problema do estudo é: o exercício físico crônico é capaz de modificar a SIIG e o efeito insulínico colinérgico reduzindo a hiperinsulinemia em roedores obesos? O objetivo do presente estudo foi caracterizar os efeitos da natação crônica sobre a SIIG e o efeito insulínico da ACH em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos obesos. Para tal, a obesidade foi induzida pela administração neonatal de Glutamato Monossódico (MSG; 4g/Kg) durante os 5 primeiros dias de vida. Ratos Controle (CON) receberam salina equimolar. Ao desmame (21 dias), os animais foram randomicamente distribuídos em exercitados (EXE; n=15) e sedentários (SED; n= 15). O exercício consistiu em natação (3x/semana/30min) mantido por 10 semanas. Aos 92 dias, os ratos foram eutanasiados, a obesidade e os parâmetros bioquímicos plasmáticos (glicose, triglicérides e insulina) foram analisados. Ilhotas pancreáticas foram isoladas pela técnica da colagenase e curvas dose-resposta ( $EC_{50}$ ) à glicose (2,8-28,8mM) e a ACH (0,001-3000  $\mu$ M) foram obtidas. Adicionalmente, outro grupo de ilhotas foi utilizado para estudar os mecanismos das vias de disparo e amplificação da SIIG. Para isto, ilhotas foram incubadas com glicose (16,7mM) na presença ou ausência de diazoxida (DZ, 250 $\mu$ M) e KCl (30mM). A participação do cálcio na SIIG foi testada em meio contendo glicose (16,7mM) mais Verapamil, (VR; 10  $\mu$ M) e/ou tapsigargina (THP; 20  $\mu$ M). Também foram feitas as expressões proteicas de MR3, da PKC e PKA em ilhotas pancreáticas isoladas. A natação foi efetiva em evitar o rompimento da homeostase glicêmica e lipídica em roedores obesos. Em ambos os grupos, as ilhotas pancreáticas de ratos exercitados apresentaram aumento da sensibilidade à glicose (< $EC_{50}$ ) em relação a ilhotas de animais SED. Este efeito foi provavelmente resultado da drástica inibição das vias amplificadoras encontrada em ilhotas de ratos exercitados de ambos os grupos. Adicionalmente, independente da obesidade, a natação reduziu o efeito colinérgico em ilhotas pancreáticas, sem modificar as expressões de MR3, PKC ou PKA ou o fluxo de cálcio. Deste modo, concluímos que a natação ao longo da vida reduz a SIIG, impedindo a hiperinsulinemia e a dislipidemia. Redução das vias amplificadoras da glicose, bem como, menor efeito colinérgico são os prováveis mecanismos envolvidos neste processo.

**Palavras-chaves:** Acetilcolina, metabolismo glicolítico, natação, obesidade, secreção insulina

# EFFECTS OF REGULAR PHYSICAL EXERCISE ON INSULIN SECRETORY CONTROL IN PANCREATIC ISLETS ISOLATED FROM OBESE RATS

## GENERAL ABSTRACT

The breakdown of energy balance results in an accumulation of adipose tissue, associated with the development of Insulin Resistance (IR) and hyperinsulinemia. Insulin secretion (IS) is highly regulated by nutrients, especially glucose, and autonomic neural signals. This process engages oxidative metabolism and alteration of the membrane potential, resulting in calcium influx and exocytosis of insulin granules in beta pancreatic cells ( $\beta$ ). The action of glucose on  $\beta$ -cells initiates triggering and amplifying pathways. Together, the IS is also modulated by the Acetylcholine (ACH), Parasympathetic Nervous System (SNP) neurotransmitter. An autonomic nervous system (SNA) maladjustment characterized by parasympathetic hyperactivity with altered sensitivity to glucose and ACH, contribute to the hyperinsulinemia present in obesity. In contrast, physical exercise reduces adipose tissue, improves IR and reduces IS. However, the direct effects on pancreatic islets and glucose responsiveness are unknown. Thus, there's the problem question: Is lifelong physical exercise capable of reducing hyperinsulinemia by modifying the glucose response and correcting the cholinergic insulinotropic effect in islets of obese rodents? Therefore, the objective of the present study was to characterize the effects of exercise on insulin secretory control in obese rats. Therefore, obesity was induced by hypothalamic lesion by monosodium glutamate (MSG, 4 g/kg) administered in the neonatal phase. Control rats (CON) received equimolar saline. After the 30th day, the animals were weaned and randomly distributed in the exercised (EXE) and sedentary (SED) groups. The exercise consisted of swimming, held three times a week, for 30 minutes throughout life. At 92 days, the rats were euthanized and anthropometric and biochemical data were collected. To evaluate glucose-induced SI, pancreatic islets were isolated and incubated in the presence of glucose (16.7 mM) and pharmacological agents that modify the effects of oxidative-glycolytic metabolism, such as diazoxide (DZ, 250  $\mu$ M) or calcium channel inhibitors (Verapamil, 10  $\mu$ M and tapsigargine, 20  $\mu$ M). Additionally, pancreatic islets were also isolated and incubated at increasing concentrations of glucose (5.6 - 24.0 mM) or ACH (0.01 - 3000  $\mu$ M) for the preparation of dose-response curves and obtaining the sensitivity to agents (EC50). The expression of the muscarinic receptor subtype 3 (MR3) major ACH was also evaluated, in addition to kinases involved in the pathway. Swimming was effective in reducing glycemia, insulinemia and triglycerides in MSG-EXE rats, compared to MSG-SED. In addition, the two groups of exercised rats had an improvement in glucose sensitivity. This event was accompanied by reduction of the glucose amplification pathway, without alteration in the expression of the proteins involved in the secretion pathway. Although pancreatic islets of MSG rats are more sensitive to blocking intracellular calcium stores, calcium responses were not modified by exercise in both groups. It is possible to conclude that the physical exercise was efficient in the reduction of the IS induced by the glucose and the cholinergic responsiveness, possibly by a decrease of the amplifying route of the secretion.

**Keywords:** Acetylcholine, glucose metabolism, insulin secretion, obesity, swimming training

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
INTRODUÇÃO GERAL	15
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	19
1. 19	
2. 21	
3. 26	
4. 30	
5. 32	
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE:	71
Protocolo para preparação de solução de Hanks	71
Protocolo para preparação de Solução de Krebs	72
Protocolo para preparação de tampão de ilhotas para Western Blotting	73
ANEXO A:	74
ANEXO B	75

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Efeito da natação regular sobre a curva dose-resposta à glicose em ilhotas pancreáticas isoladas e sua sensibilidade à glicose. 69
- Figura 2.** Resposta colinérgica e expressão de MR3, PKA e PKC em ilhotas pancreáticas isoladas. 69
- Figura 3.** Via desencadeadora e amplificada da secreção de inulina nas ilhotas isoladas. 70
- Figura 4.** Participação do íon cálcio na secreção de insulina induzida pela glicose. 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da atividade física crônica nos parâmetros biométricos e bioquímicos.....	74
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	.....	Graus Celsius
μM	.....	Micromolar
ACH	.....	Acetilcolina
ADP	.....	Adenosina Difosfato
AGL	.....	Ácidos Graxos Livres
ARQ	.....	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
ATP	.....	Adenosina Trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	.....	Íons cálcio
CAF	.....	Dieta de Cafeteria
CCH	.....	Carbacol
CEUA	.....	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	.....	Centímetros
CON	.....	Controle
DAG	.....	Diacilglicerol
dL	.....	Decilitro
DM2	.....	Diabetes <i>mellitus</i> tipo II
DZ	.....	Diazoxida
EXE	.....	Exercitado
g	.....	Gramas
GH	.....	Hormônio de Crescimento
Gi	.....	Proteína G Inibitória
GK	.....	Glicoquinase
GLUT-2	.....	Transportador de Glicose do Tipo 2
GLUT-4	.....	Transportador de Glicose do Tipo 4
Gq	.....	Proteína G Subtipo q
GRP	.....	Peptídeo Liberador de Gastrina
IGF-1	.....	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IMC	.....	Índice de Massa Corpórea
IP3	.....	Inositol 1,4,5-trifosfato
K <sup>+</sup>	.....	Íon Potássio
K-ATP	.....	Canal de Potássio Sensível a Adenosina Trifosfato

Kg	Quilograma
KCl	Cloreto de Potássio
L	Litro
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
m <sup>2</sup>	Metro Quadrado
mg	Miligrama
MgADP	Adenosina Difosfato Dependente de Magnésio
Mmol	Milimolar
MSG	Glutamato Monossódico
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ng	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de Significância
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
RI	Resistência à Insulina
RIE	Radioimunoensaio
RM	Receptor Muscarínico
RM1	Receptor Muscarínico Subtipo 1
RM2	Receptor Muscarínico Subtipo 2
RM3	Receptor Muscarínico Subtipo 3
RM4	Receptor Muscarínico Subtipo 4
RM5	Receptor Muscarínico Subtipo 5
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SED	Sedentário
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SUR1	Receptor de Sulfoniluréia

THP ..... Tapsigargina  
Unicamp ..... Universidade de Campinas  
Unioeste ..... Universidade do Oeste do Paraná  
VIP ..... Peptídeo Intestinal Vasoativo  
VMH ..... Hipotálamo Ventromedial  
VR ..... Verapamil

## INTRODUÇÃO GERAL

Alterações da homeostase energética promovem a longo prazo a expansão excessiva do tecido adiposo, resultando em obesidade, um fenômeno crescente no mundo (PANG et al., 2014; BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2010). A hipertrofia dos adipócitos ocasiona um rompimento de sua ação endócrina elevando a produção e liberação de substâncias pró-inflamatórias, denominadas de adipocinas, que têm papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina (RI) (BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2010). A RI associada a obesidade, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, dislipidemia e complicações cardiovasculares definem a Síndrome Metabólica (SM) (WILCOX, 2005). Embora a obesidade possa ser desencadeada por alterações neurais, hormonais ou genéticas, o desequilíbrio do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e a resultante hipersecreção de insulina são elementos centrais na fisiopatologia da obesidade (PANG et al., 2014).

A secreção de insulina é um processo altamente regulado, acionado principalmente pelo aumento de nutrientes circulantes, em especial a glicose. No pâncreas endócrino a glicose é captada pela célula beta ( $\beta$ ) pancreática. Uma vez no interior da célula  $\beta$ , a glicose será metabolizada resultando em aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), o qual promoverá o fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP (K-ATP) presentes na membrana da célula, culminando com uma despolarização da membrana da célula  $\beta$ . Tal processo desencadeia a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes e a elevação do cálcio intracelular aciona a maquinaria excitotóxica da célula, estimulando a fusão dos grânulos secretores de insulina (RUTTER et al., 2015). O fechamento dos canais de K-ATP é fundamental na regulação da secreção de insulina disparada por glicose (HENQUIN, 2009). Estudos farmacológicos e moleculares mostram que a secreção de insulina desencadeada pela glicose é resultando do acoplamento entre o metabolismo glicolítico e oscilações do potencial de membrana que resultam em influxo de cálcio, um evento conhecido como via desencadeadora ou via dependente dos canais de K-ATP. Porém, estudos posteriores mostraram que a glicose também é capaz de acionar uma segunda via, a qual é complementar à primeira, mas não depende do fechamento dos canais de K-ATP. Essa via é denominada de amplificadora ou independente dos canais de K-ATP e melhora a eficácia dos íons cálcio na maquinaria excitotóxica de insulina (GEMBAL;

GILON; HENQUIN, 1992; SATO et al. 1992). Em síntese, a via desencadeadora (dependente dos canais K-ATP) ocorre quando há a presença de uma concentração estimulatória de glicose, a qual desencadeia a produção de ATP. Resultando no fechamento dos canais K-ATP e despolarização da membrana, possibilitando a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente e influxo do íon, com consequente estimulação da maquinaria excitotóxica de grânulos de insulina. De maneira complementar, a via amplificadora (independente dos canais K-ATP) ocorre sem a interferência destes canais e apenas quando a secreção é disparada pela glicose, aumentando a eficácia dos íons cálcio e estimulando a secreção (HENQUIN, 2009).

Além da estimulação por nutrientes, outras substâncias poderão ser potencializadoras da secreção de insulina, entre as quais destaca-se a acetilcolina (ACH), o principal neurotransmissor liberado pelos terminais vagais parassimpáticos que inervam o pâncreas endócrino. O efeito insulínico da ACH depende de sua interação com receptores muscarínicos (RM) presentes na membrana das células  $\beta$  (BOSCHERO et al. 1995). Embora diferentes subtipos de RM possam estar presentes na membrana da célula  $\beta$  pancreática, a ligação da ACH ao RM subtipo 3 (RM3) é considerada a principal via potencializadora da secreção de insulina. Essa ligação desencadeia a liberação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), considerados mensageiros secundários, que levarão a secreção de insulina através do aumento da eficácia dos íons cálcio, mediado pela ação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC) (GAUTAM et al, 2007). Conforme mencionado anteriormente, alterações do SNA, parecem ter um papel importante na hipersecreção de insulina (GILON; HENQUIN, 2001). Dentro deste contexto, ilhotas pancreáticas isoladas de roedores obesos apresentam alterações na responsividade a ACH, bem como, nas vias de sinalização acionadas pelo RM3 (KARLEN-AMARANTE et al., 2012). Procedimentos cirúrgicos ou farmacológicos que corrijam a ação insulínica da ACH evitam a hiperinsulinemia e atenuam obesidade e RI, dentre estes, estão a vagotomia e a administração de atropina (LUBACZEUSKI et al., 2015; KIBA et al., 1996). Adicionalmente no estado de RI, os RM estão mais ativados em humanos e roedores (AHRÉN, 2000). Deste modo, corrigir a atividade autonômica, pode favorecer o controle adequado da secreção de insulina. Neste contexto, o exercício físico é um potente ativador de via catabólicas autonômicas que resultam em perda de peso e melhora no metabolismo, tornando-se capazes de melhorar a RI e evitar a hiperinsulinemia

surgindo, portanto, como importante ferramenta no restabelecimento da homeostase energética (SCOMPARIN et al., 2009; SOLOMON et al., 2008; GIORDANO et al., 2006; DEBUYSER, DREWS, HENQUIN, 1991). Adicionalmente, o exercício parece realizar efeitos localizados nas ilhotas: em animais diabéticos houve redução da degradação da ilhota e diminuição do diâmetro das mesmas (RAWAL et al., 2013), enquanto em roedores com dieta hiperlipídica, a atividade física causou aumento de células  $\beta$  por hiperplasia e pela diminuição da apoptose (PARK et al., 2007). Até o presente momento, há controvérsias entre o efeito do exercício físico sobre as ilhotas, e os únicos dois estudos que abordam sobre o efeito insulíntrópico da ACH sobre as ilhotas de ratos obesos por glutamato monossódico (MSG) possuem respostas muito diversas entre si (MIRANDA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013).

Diferentes modelos experimentais em roedores têm sido criados para avaliar o impacto da obesidade sobre a saúde. A administração de elevadas doses de MSG no período neonatal induz lesões hipotalâmicas, que resultam em desajuste autonômico, caracterizado por hiperativação parassimpática e hipoativação simpática, contribuindo para o desenvolvimento de hiperinsulinemia, RI, intolerância à glicose, dislipidemia e obesidade na vida adulta (ELFERS; RALSTON; ROTH, 2011; SCOMPARIN et al., 2009; TORREZAN et al., 2006; OLNEY, 1969). Deste modo, a obesidade MSG reproduz as características marcantes de SM também encontradas em indivíduos obesos sendo, portanto, excelente modelo para estudar a obesidade. Roedores MSG submetidos ao exercício físico regular (LEITE et al., 2013) ou vagotomia subdiafragmática (LUBACZEUSKI et al., 2015) em idade jovem, apresentam menor conteúdo de tecido adiposo, melhora dos parâmetros bioquímicos, com redução da hiperinsulinemia e RI e restauração da homeostase glicêmica. Nestes roedores a hiperatividade vagal é importante mediador da hiperinsulinemia (LUBACZEUSKI et al., 2015). Ilhotas pancreáticas isoladas de roedores MSG apresentam fraca resposta insulíntrópica a ACH ou a agentes colinérgicos (MIGUEL et al., 2002) além de alterações na expressão do RM3 (MIRANDA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013). Todavia, os estudos em ilhotas de roedores MSG são escassos e contraditórios, em especial quando exploram as ações colinérgicas. Assim, Ribeiro et al. (2013) mostraram que ilhotas pancreáticas isoladas de roedores MSG apresentam redução do número de RM3, bem como da cascata de sinalização acionada pelo mesmo. Por outro lado, Miranda et al. (2014) demonstraram que a expressão de RM3 em ilhotas pancreáticas de roedores MSG está elevada. Para

estes autores, a explicação para a fraca responsividade à ACH está na presença também aumentada de outros subtipos de RM, os quais ao serem acionados pela ACH promovem uma ação inibitória sobre a secreção de insulina induzida por glicose. Exposto isso, nossa questão problema é: a natação regular pode evitar a hipersecreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de rato MSG obesos? Nossa hipótese é de que, a atividade física mantida ao longo da vida reduza os efeitos da glicose sobre a secreção de insulina e por reduzir a atividade parassimpática para o pâncreas, modifique a ação insulínica da ACH.

# REVISÃO GERAL DE LITERATURA

## 1. Obesidade e Resistência à Insulina

A homeostase, definida como a manutenção das condições constantes do meio interno é uma condição necessária ao funcionamento do organismo e, desta forma, está diretamente implicada no estado de saúde do indivíduo. No contexto do metabolismo, a homeostase energética é garantida pelos mecanismos neurais e hormonais que ajustam as calorias ingeridas ao gasto energético. Dentre os diferentes hormônios que podem afetar o metabolismo corporal, destaca-se a insulina, a qual exerce uma função regulatória sobre os principais substratos energéticos do nosso organismo modulando o metabolismo glicêmico, lipídico e proteico (PANG et al., 2014; WILCOX, 2005). Deste modo, um desequilíbrio na secreção ou função desse hormônio leva a um processo de ruptura da homeostase energética e, frequentemente, resulta em hiperglicemia, dislipidemia e alterações na síntese proteica, as quais associadas à expansão excessiva do tecido adiposo, favorecem a instalação de patologias tais como, diabetes e complicações cardiovasculares (GUSTAFSON, 2015).

Alterações do peso corporal, em particular o sobrepeso e a obesidade, tornaram-se nas últimas décadas grandes problemas de saúde a nível mundial. Ambas condições são caracterizadas pelo excesso de tecido adiposo branco e resultam em complicações para a saúde que reduzem a qualidade e expectativa de vida dos indivíduos (BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2010). Utilizando-se da relação entre o peso corporal (Kg) e a estatura (m<sup>2</sup>) obtêm o Índice de Massa Corporal (IMC), um parâmetro frequentemente usado para avaliar alterações do peso corporal. Indivíduos com IMC entre 25 e 30Kg/m<sup>2</sup> são considerados com sobrepeso, enquanto aqueles com IMC acima de 30Kg/m<sup>2</sup> são classificados como obesos (HIRKO et al., 2015; MENEZES et al., 2012) O IMC apresenta boa correlação entre sua classificação e estados patológicos, em especial indivíduos classificados como obesos tem maior chance de desenvolver diabetes ao longo da vida. Todavia é importante reconhecer que o IMC apresenta suas limitações, visto que não explora a composição corporal, bem como, as diferenças entre os sexos (ROTHMAN, 2008). Adicionalmente, o IMC não é o melhor critério para relação peso corporal e condição metabólica, visto que 30% dos obesos não apresentam desordens metabólicas, enquanto a mesma porcentagem de magros

possui tal alteração (GUSTAFSON, 2015). Porém, pela sua praticidade, o IMC é usado em estudos epidemiológicos, particularmente de larga escala. Usando-o, foi demonstrado que no Brasil em 2016 cerca de 53,8% da população apresentava sobrepeso, enquanto 18,9% estava na faixa de obesidade ( $IMC \geq 30$ ). O Paraná figura como um dos estados em que ao sobrepeso está presente em mais da metade da sua população, 54,2% dos moradores da capital do estado, Curitiba, estão com o  $IMC > 25$  (BRASIL, 2016). O rápido avanço do sobrepeso e obesidade na população brasileira é um evento preocupante, visto que estas condições contribuem de forma significativa para o desenvolvimento de doenças crônicas como as doenças cardiovasculares e o DM2 (SOUZA et al., 2016). No Brasil, entre os anos de 2006 e 2016, houve um aumento de 61,8% no número de diabéticos diagnosticados, enquanto no ano de 2006, 5,5% da população apresentava a doença. Em 2016, esse número passou para 8,9%, com maior prevalência em mulheres (BRASIL, 2016). Este avanço da relação entre obesidade e DM2 também pode ser vista em dados mundiais, os quais segundo a OMS estimam que em 2025 a diabetes deverá atingir cerca de 300 milhões de pessoas, sendo 97% desses indivíduos portadores de DM2 (RUDKOWSKA, 2009). Como exposto anteriormente, a expansão e acúmulo excessivo de tecido adiposo são elementos centrais envolvidos na fisiopatologia da obesidade. Evidências experimentais das últimas décadas têm demonstrado que o tecido adiposo, além de seus clássicos papéis como armazenador de energia e isolante térmico é fundamental na manutenção do equilíbrio de energia, em especial por sua ação endócrina. Os adipócitos produzem e liberam diferentes substâncias, com ações locais e endócrinas, dentre as quais destacam-se substâncias similares às citocinas, denominadas adipocinas. Quando há aumento do tecido adiposo, em especial por hipertrofia celular, o adipócito eleva a produção destas citocinas, produzindo um estado de inflamação crônica subclínica característica da obesidade, a qual está diretamente relacionado a SM (BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2010). A SM é caracterizada, de forma genérica, por obesidade visceral, hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia, sendo a hiperinsulinemia e a RI os fatores mais importantes neste quadro (REAVEN, 1988). A SM é uma condição que predispõe a instalação de doenças crônico-degenerativas (YAO et al., 2017)

A RI é uma condição importante na evolução da obesidade para a instalação do DM2 (YAO et al., 2017). A insulina regula a glicemia por ações em diferentes tecidos, em especial o fígado, músculo e tecido adiposo. O tecido adiposo é considerado um

tecido insulino-dependente, assim como o muscular. Em ambos, a ligação da insulina ao seu receptor de membrana promove a ativação de cascatas de sinalização que resultam na translocação do Transportador de Glicose subtipo 4 (GLUT-4) do interior da célula para a membrana permitindo a difusão facilitada da glicose. Assim, diante de uma RI ocorre aumento gradativo da glicemia, uma vez que os adipócitos e as células musculares esqueléticas não estão captando a glicose. No tecido hepático, diferente dos outros citados, a entrada da glicose não é dependente da insulina, todavia a ligação da insulina ao receptor promove eventos que resultam na estimulação da glicogênese enquanto inibem glicogenólise hepática. Deste modo, a RI hepática agrava a hiperglicemia, por elevar a concentração de glicose plasmática (WILCOX, 2005). Durante a progressão da RI, ocorre uma compensação pancreática que resulta em hipersecreção de insulina e alterações de proliferação do pâncreas endócrino, a quais a longo prazo induzem a morte de células beta ( $\beta$ ) pancreáticas e resultam na instalação definitiva do DM2 (CNOP et al., 2005; WILCOX, 2005). Deste modo, compreender a relação entre expansão do tecido adiposo, RI e pâncreas endócrino é importante para atenuar ou evitar a instalação de quadros patológicos.

## 2. Secreção de Insulina: Via desencadeadora e amplificadora

O pâncreas é uma glândula mista, constituído por tecidos exócrino e endócrino. A porção endócrina do órgão é responsável pela produção e secreção de hormônios essenciais na manutenção do controle energético, em especial a insulina. A porção endócrina do pâncreas é formada por agregados celulares denominados de ilhotas pancreáticas ou Ilhotas de Langerhans, as quais perfazem aproximadamente 1% do total do órgão, sendo constituídas pela reunião de diferentes subtipos celulares: células  $\alpha$  (produtoras do hormônio glucagon), as células  $\beta$  (produtoras do hormônio insulina), as células  $\delta$  (produtoras do hormônio somatostatina) e pequena proporção de células PP (produtoras de polipeptídeo pancreático) e células  $\epsilon$  (produtoras do hormônio grelina). O tipo celular mais frequente nas ilhotas pancreáticas é a célula  $\beta$  que ocupa o centro da ilhota, enquanto as células  $\alpha$ ,  $\delta$ , PP e  $\epsilon$  distribuem-se na periferia (RUTTER et al., 2015; MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009).

A insulina é um hormônio peptídico que regula a homeostase da glicose além de ser importante para manutenção do metabolismo lipídico e proteico, a sua secreção depende da ativação da célula  $\beta$ . Nas células  $\beta$  pancreáticas ocorre um acoplamento

entre metabolismo celular e alterações do potencial de membrana que resultam em liberação de insulina (WILCOX, 2005). Este processo envolve captação de glicose, metabolismo e fechamento de canais de K-ATP e influxo de cálcio (RUTTER et al., 2015). Embora a glicose seja o nutriente mais importante para disparar o processo secretório, outros nutrientes podem agir como secretagogos, tais como aminoácidos e ácidos graxos (GILON; HENQUIN, 2001).

Na obesidade ocorrem alterações no controle secretor de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, os quais favorecem a hiperinsulinemia e a longo prazo, a falência da célula  $\beta$  (WILCOX, 2005). Por exemplo: a obesidade induzida por dietas ricas em calorias pode resultar na diminuição da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do GLUT-2 e também reduzir a translocação do transportador para a membrana plasmática, resultando em menor expressão de tais proteínas na membrana da célula  $\beta$ . Essa pode ser uma das razões para a diminuição da sensibilidade da glicose decorrente de hiperglicemia (CERF, 2007).

Além da alteração no transportador, a dieta hipercalórica pode danificar a produção da enzima glicoquinase (GK) que age de forma imediata após a entrada da glicose na célula, preparando-a para a glicólise. Porém, em ratos com manutenção de dieta com alta concentração de calorias por várias semanas, foi observado uma diminuição do RNAm da GK, diminuindo sua expressão e, conseqüentemente, sua ação. Essa inibição gera uma diminuição expressiva na secreção de insulina induzida pela glicose, já que ela se mantém ativa até mesmo com alta concentração do produto catalisado por ela, a glicose-6-fosfato (CERF, 2007).

Além das altas concentrações de calorias providas da dieta, a grande quantidade de ácidos graxos livres (AGL) presentes na circulação é um fator negativo para a homeostase glicêmica. Esse fator pode causar um aumento da presença de triglicerídeos na ilhota, o que está relacionado com a deterioração das células  $\beta$ . Nos primeiros estágios do DM2, pacientes diabéticos apresentam alta quantidade de AGL nas células  $\beta$  pancreáticas, um evento que promove hiperinsulinemia no jejum e intolerância à glicose no período pós-prandial. Além disso, a presença de AGL gera um estresse oxidativo que causa danos funcionais nas células  $\beta$ , o que a longo prazo reduz sua capacidade secretória e favorece a hiperglicemia (CERF, 2007).

Modelo de obesidade como Zucker (*fa/fa*) são alterados geneticamente, resultando no desenvolvimento de DM2 na idade adulta. Esses roedores possuem mutações no

receptor de leptina, levando a obesidade e estado pré-diabético até a décima semana de vida. A partir dessa idade também apresentam o aumento da glicemia, configurando o estado de DM2 instalado (PICK et al., 1998). Nesse modelo há frequente ruptura e redução das células presentes nas ilhotas e diminuição do seu conteúdo de insulina (RAWAL et al., 2013). Ainda como modelos alterados geneticamente, existem os ratos *ob/ob*, nos quais suas mutações reduzem a produção do hormônio leptina. Por tal alteração, os animais se tornam hiperfágicos, com desenvolvimento de obesidade, hipersecreção de insulina e hiperglicemia. Nesses animais, as ilhotas são de maior diâmetro e com um aumento do conteúdo de grânulos de insulina (LINDSTRÖM, 2007). De fato, estudos das últimas décadas têm aumentado a nossa compreensão do controle secretório de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e, deste modo, novos elementos têm sido incorporados, em especial sobre a maneira como a glicose estimula a secreção de insulina. Detalhes destes mecanismos serão descritos abaixo.

O processo secretório da insulina inicia-se com a captação da glicose pela célula  $\beta$  pancreática, um mecanismo de difusão facilitada mediado pelo GLUT-2. A cinética do deslocamento da glicose via GLUT-2 mostra que este transportador tem baixa afinidade com a glicose, portanto, é necessária alta concentração plasmática de glicose para elevar a velocidade de deslocamento (BYERS; HOWARD; WANG, 2017). Após a internalização, a glicose será posteriormente fosforilada na posição 6 da molécula, gerando a glicose-6-fosfato, uma ação dependente da GK. A glicose-6-fosfato é posteriormente degradada na via aeróbica glicolítica, a qual inclui a glicólise citoplasmática, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, resultando em aumento da produção de ATP intracelular. O aumento da razão ATP/ADP resulta no fechamento dos canais K-ATP e a retenção do íon potássio intracelular provoca a despolarização da membrana, resultando na abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e conseqüente influxo do íon cálcio. O influxo de cálcio é responsável pela ativação da maquinaria excitotóxica e culmina no deslocamento, reconhecimento e fusão dos grânulos de insulina armazenados no interior da célula  $\beta$  (RUTTER et al., 2015; MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009; ASCROFT, 2006; HABER et al., 2001).

A secreção resultante acontece em duas fases, por isso, é denominada de secreção bifásica. A primeira fase ocorre imediatamente após a estimulação e tem uma curta duração, com pico de 3 a 5 minutos, durando no máximo 10 minutos, porém, é de

grande importância. Nessa primeira etapa há a liberação de grânulos previamente produzidos que estão próximos à membrana e são liberados rapidamente. Na sequência, há a segunda fase de secreção que pode persistir por até duas horas no intuito de promover a normalização da glicemia. Nesta segunda fase há liberação de uma menor quantidade de grânulos, que estão mais distantes da membrana, e também pode ser necessária a produção de novos grânulos para suprir a necessidade de secreção (MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009; WILCOX, 2005).

Estas fases são claramente evidenciadas durante o estado pós-prandial, todavia é importante lembrarmos que há uma secreção anterior ao aumento da glicemia plasmática, essa é denominada fase cefálica da secreção de insulina. Essa fase é desencadeada por estímulos sensoriais, em particular pelos sentidos olfatórios e visuais, cujas aferências resultam em ativação do ramo parassimpático autonômico e liberação de ACH pelo nervo vago, resultando em aumento de insulina. A fase cefálica parece importante para antecipar o processo secretório e assim, evitar grandes elevações da glicemia plasmática (RUTTER et al., 2015).

A secreção disparada pela glicose é modulada por vários fatores, tais como neurotransmissores autonômicos, hormônios e incretinas liberadas pelo sistema digestório (WILCOX, 2005). A complexa interação destes eventos garante estimulação e inibição adequadas da secreção de insulina, evitando o rompimento da homeostase glicêmica e o consequente aparecimento de doenças metabólicas (RUTTER et al., 2015). Deste modo, no período pós-prandial em consequência da presença de glicose no sangue, há a liberação de insulina que, por sua vez, estimula a captação de glicose nos tecidos periféricos. Além da interiorização da glicose, a insulina age também no metabolismo lipídico, sendo que a concentração elevada do hormônio no sangue é um grande inibidor da lipólise além de potente estimulador da lipogênese (BOADA; MARTÍNEZ-MORENO, 2013). Fatores genéticos, comportamentais e/ou fisiológicos podem levar a uma ruptura da homeostase energética e redução da sensibilidade à insulina, a qual induz inicialmente a uma hipersecreção de insulina e, a longo prazo promove uma perda progressiva da massa das células  $\beta$  que levam ao aparecimento do DM2. A RI é molecularmente caracterizada por um defeito de sinalização após a ativação do receptor de insulina o que reduz a migração e o número de GLUT-4 na membrana dos tecidos insulino-dependentes (WILCOX, 2005).

Como brevemente exposto anteriormente, em condições não excitatórias os canais K-ATP estão abertos, resultando em efluxo de K<sup>+</sup> e consequente manutenção da polarização da membrana da célula β pancreática. Aumento da glicemia, tal como ocorre, no estado pós-prandial eleva o metabolismo oxidativo da glicose, promovendo aumento da relação ATP/ADP e o fechamento dos canais K-ATP. Este efeito causa a despolarização da membrana da célula β pancreática, abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente, com o influxo desse íon para o meio citosólico e secreção de insulina. Esta via é definida como via desencadeadora da secreção de insulina e provavelmente sustenta o pico secretório característico da primeira fase de liberação do hormônio. A participação dos canais de K-ATP é um evento chave na via denominada desencadeadora. Esses canais são complexos e formados pela subunidade proteica estrutural KIR, poro por onde flui o íon K<sup>+</sup>, e outra subunidade proteica que tem função reguladora a SUR1 (HENQUIN, 2009).

O ATP liga-se à subunidade KIR, promovendo uma mudança conformacional e a inibição do canal K-ATP. Já a ligação de ADP dependente de magnésio (MgADP) antagoniza a ação do ATP. Conhecendo a cinética de funcionamento do canal K-ATP diferentes agentes farmacológicos atuam sobre esta estrutura. Assim, as sulfoniluréias, uma família de agentes hipoglicemiantes, é capaz de se ligar à subunidade SUR1 causando mudança conformacional que mimetiza o efeito do ATP, ou seja, fecha o canal culminando com aumento da secreção de insulina (ex: fármaco glibenclâmida) (BRYAN et al., 2004).

De forma antagônica, a DZ ao interagir com a subunidade SUR1, impede o fechamento dos canais K-ATP e alteração de voltagem na membrana, o que culminaria com o bloqueio da secreção de insulina (HENQUIN, 2009). A importância desta regulação para o controle secretor de insulina é claramente demonstrada em estudo de Doliba et. al. (2006). Estes autores mostraram que ratos sem expressão da subunidade SUR1 apresentam uma taxa de secreção de insulina alta, até mesmo em baixas concentrações de glicose ou em sua ausência, resultado de um influxo desregulado de cálcio em consequência de falhas no controle do canal K-ATP.

Porém, estudos com a DZ demonstram que a glicose pode agir por via diversa daquela dependente do canal K-ATP, um evento inicialmente denominado de via independente do canal K-ATP, atualmente conhecido como via amplificadora da glicose sobre a secreção de insulina. Para provar que a glicose era capaz de estimular a

secreção de insulina, mesmo quando o fechamento de canais de K-ATP era evitado, Gembal et al. (1992) montou o seguinte protocolo: ele despolarizou a célula  $\beta$  pancreática por colocá-la em meio extracelular contendo elevado KCl, e manteve os canais K-ATP abertos pelo DZ. A adição de glicose nesta situação foi capaz ainda de estimular a secreção de insulina (HENQUIN, 2009). Diferentes estudos posteriores (HENQUIN; DUFRANE; NENQUIN, 2006; HENQUIN et al., 2003; HENQUIN, 2000) incluindo do nosso grupo, confirmaram a presença desta via em ilhotas pancreáticas isoladas de roedores (GRASSIOLLI et al., 2006). Similarmente, esta via também ocorre em ilhotas pancreáticas de humanos (STRAUB et al., 1998).

Em roedores, para que a célula  $\beta$  altere seu estado basal para o estado secretório, é necessária a presença de uma concentração aproximada de 6 a 7 mmol/L de glicose, para promover o influxo necessário de cálcio para desencadear a secreção. Porém, ainda no estado não-excitatório a glicose pode amplificar sinais produzidos nessas circunstâncias, mas sem atingir o pico de cálcio desencadeador. Ou seja, a glicose age tanto no aumento da concentração de cálcio, quanto na melhora da efetividade do íon. Lembrando que as duas vias são dependentes de cálcio (HENQUIN, 2009).

### 3. Estímulo colinérgico como potencializador da secreção de insulina

Dentre os diversos agentes capazes de modular o controle secretor de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas destaca-se o efeito dos neurotransmissores autonômicos, em especial, a ACH. Para que a ACH seja liberada no tecido endócrino pancreático, há a necessidade da estimulação do SNP, ramo do SNA. A inervação pancreática do SNP ocorre via nervo vago (X par craniano), iniciando com neurônios pré-ganglionares oriundos no núcleo ambíguo e núcleo motor dorsal do vago, no tronco encefálico, os quais se dispersam até a chegada ao tecido exócrino do pâncreas. Nesse local, ocorre a primeira sinapse com o gânglio nervoso e, a partir dele são lançadas fibras pós-ganglionares que inervam densamente as ilhotas pancreáticas. Outros sinalizadores podem ser liberados dos terminais vagais pós-ganglionares tais como óxido nítrico (NO), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo liberador de gastrina (GRP); porém a ACH é o principal agente modulador da secreção de insulina na célula  $\beta$  pancreática (GILON; HENQUIN, 2001). A ação insulínica da ACH depende de sua interação com os receptores de membrana, acoplados à proteína G, os denominados receptores muscarínicos (RM). Em todos os tecidos já foram identificados pelo menos cinco

subtipos de RM classificados como RM1, RM2, RM3, RM4, RM5. Eles se diferenciam quanto a distribuição tecidual e via intracelular, assim RM1, RM3 e RM5 são ligados à proteína G subtipo q (Gq) e os subtipos RM2 e RM4 são ligados à família de proteína G inibitória (Gi) (GAUTAM et al., 2007). Um dos primeiros estudos a desvendar a ação da ACH nas células  $\beta$  pancreáticas foi realizado por Boschero et al. (1995). Neste estudo os autores demonstraram que a ação potencializadora da secreção de insulina induzida pela ACH era mediada pelos subtipos RM1 e RM3 presentes nas células  $\beta$ . Todavia, em 2002 Miguel et al. usando linhagens tumorais secretoras de insulina (BRiNBD11), mostrou que a ACH poderia exercer também efeitos inibitórios sobre a secreção de insulina induzida por glicose por ação nos RM2 e RM4. Posteriormente, técnicas moleculares (Western Blotting) e farmacológicas (antagonistas colinérgicos, como atropina) têm indicado ainda a presença nas células secretoras dos subtipos RM2 e RM4 com ação inibitória sobre a secreção de insulina (MIRANDA et al., 2014).

Todavia, o subtipo de RM3 tem sido reconhecido como mais importante mediador do efeito colinérgico da ACH na membrana da célula  $\beta$ . Usando modelos em roedores sem a expressão do RM3, foi possível demonstrar que sem a presença desse subtipo, não há potencialização da secreção pela ACH (GAUTAM et al, 2007). Nas células  $\beta$ , a interação da ACH aos receptores RM3 desencadeia vias diversas de transdução que tem como resultado um maior influxo de cálcio. Deste modo, o efeito insulínico da ACH é dependente da presença da glicose e do íon cálcio em concentrações suficientes, caso contrário, ela não consegue manter a secreção, porém, se estes estiverem em concentrações ótimas a ACH se torna um ótimo potencializador da secreção (MATHIAS; TORREZAN; GRASSIOLLI, 2009; GILON; HENQUIN, 2001).

Dentro deste contexto, os principais mecanismos de ação da ACH potencializando a secreção de insulina, envolvem o cálcio. No primeiro, a ACH desencadeia o aumento da concentração de cálcio e este, por sua vez, atuaria na maquinaria de exocitose dos grânulos de insulina e também na movimentação dos grânulos para os sítios de secreção. No segundo mecanismo, a ACH torna o cálcio mais efetivo na exocitose, isso pode acontecer por vários mecanismos, principalmente, pela ação de PKC que sensibiliza a maquinaria responsável pela exocitose, facilitando a ação do cálcio (GILON; HENQUIN, 2001).

A potencialização induzida pela ACH e o aumento da concentração do cálcio são dependentes dos produtos do metabolismo da glicose, como a produção de ATP. De

fato, a geração de sinais de cálcio que são necessários para a ação da ACH, são dependentes da mobilização do cálcio presente nos estoques extracelulares, por influxo, e também mobilização daqueles presentes em vesículas intracelulares, demandando a ligação com IP3 (SCHÖFL et al., 2000). Por isso, quando há a potencialização pelo neurotransmissor, há um aumento da concentração de cálcio intracelular que ocorre por dois mecanismos distintos: quando há alta concentração de glicose e presença da ACH há entrada de cálcio através dos canais voltagem-dependentes, porém, em baixas concentrações de glicose e altas do neurotransmissor, há deslocamento dos íons presentes nos estoques intracelulares. O primeiro mecanismo necessita da presença de uma concentração de glicose maior que 5 mM, já o segundo necessita de alta concentração do neurotransmissor, independente da presença da glicose e de altas concentrações extracelulares de cálcio (GILON; HENQUIN, 2001). É importante salientar que o uso de sulfoniluréias com fechamento dos canais de K-ATP ajudam na potencialização dos sinais de cálcio induzidos pelo estímulo colinérgico, mesmo na ausência da glicose. Porém, a presença da glicose é importante, já que além do fechamento dos canais de K-ATP, da produção de ATP e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) (agem como reguladores), também é responsável pelo aumento da produção de IP3 (SCHÖFL et al., 2000).

Adicionalmente, um estudo realizado com ilhotas de roedores e adição de ACH reforçou a importância da via amplificadora na magnitude da secreção de insulina. Comparou-se a secreção de insulina induzida por altas concentrações de glicose (15 e 30 mM) e a secreção induzida por baixa concentração de glicose (3 mM) com adição de 100 µM de tolbutamida (sulfoniluréia), com posterior adição de ACH (1 µM). Em ambas situações houve secreção de insulina, porém na presença de elevada concentração de glicose, a magnitude da secreção foi muito maior comparada com aquela que teve adição de sulfoniluréia. Este resultado é decorrente do efeito da via amplificadora, a qual é desencadeada apenas quando a secreção é induzida pelo açúcar (GILON; HENQUIN, 2001). A via amplificadora é fisiologicamente importante, visto que ela sustenta a secreção de insulina por um longo tempo, garantindo a manutenção da glicemia e evitando a hiperglicemia. Por outro lado, em períodos de jejum, a regulação da ativação do estímulo colinérgico, através da concentração de cálcio é benéfica. Já que uma vez que o ATP, oriundo do metabolismo glicolítico, estará baixo, evitando que a ACH ative o processo cálcio-dependente e a secreção de insulina, o que impede uma hipoglicemia

(SCHÖFL et al., 2000). Em adição, conforme comentado anteriormente, a ACH também contribui para a denominada fase cefálica da secreção de insulina.

Deste modo, os efeitos colinérgicos sobre o pâncreas endócrino são essenciais para ajustar os níveis de insulina às necessidades fisiológicas do organismo e, deste modo, preservar a homeostase glicêmica. Dentro deste contexto, alterações do fluxo autonômico para o pâncreas endócrino, em particular a hiperestimulação do SNP promove a hiperinsulinemia. Diversos modelos de obesidade em roedores bem como humanos obesos apresentam hiperatividade do SNP a qual tem ligação direta com hiperinsulinemia, expansão do tecido adiposo e a RI (LUBACZEUSKI et al., 2015; KARLEN-AMARANTE et al., 2012; SCOMPARIN et al., 2009). Similarmente, um estudo realizado com primatas demonstrou que embora a atividade colinérgica não estivesse alterada no jejum em animais pré-diabéticos, após a sobrecarga de glicose, estes apresentaram hiperatividade colinérgica comparado aos animais controle (CLARK et al., 2009).

Enquanto o SNP estimula a secreção de insulina, o seu ramo antagônico o sistema nervoso simpático (SNS), libera catecolaminas que são importantes na inibição da secreção de insulina. Esse estímulo adrenérgico, realizado pelo SNS, é ativado em situações de estresse, como de exercício físico ou jejum, sendo importante para evitar a ruptura da homeostase energética. Uma vez que impede a ação hipoglicemiante da insulina enquanto eleva a concentração de glicose plasmática, a qual, nestas situações é direcionada ao Sistema Nervoso Central (SNC) (DEBUYSER; DREWS; HENQUIN, 1991). A atividade física de um modo geral, modula os ramos autonômicos e exerce efeitos diretos sobre a secreção e ação do hormônio insulina. Adicionalmente, o exercício físico, por elevar o gasto energético, favorece a redução de tecido adiposo e a consequente melhora na RI evitando o rompimento da homeostase glicêmica. No estudo de Gautam et al. (2006), os pesquisadores criaram três diferentes modelos de obesidade em roedores: *ob/ob* (deficiência de leptina), dieta hiperlipídica e animais com lesões na área Hipotálamo Ventromedial (VMH) do hipotálamo, adicionalmente parte desses animais possuíam deficiência na expressão do RM3, fazendo com que a ACH não realizasse o mesmo efeito insulínico nessas ilhotas. Os resultados demonstraram melhora da homeostase glicêmica dos animais com deficiência de RM3, com diminuição da alimentação e aumento da energia gasta. Adicionalmente, o estímulo adrenérgico desses roedores é aumentado; tal resultado pode também ser

encontrado com a utilização de antagonistas colinérgicos e também pela estimulação do SNS, como no exercício físico.

#### 4. Exercício físico e o Controle Secretor de Insulina

O exercício físico é um dos métodos mais efetivos no controle do peso corporal, em especial a longo prazo (GOMES et al., 2013). Adicionalmente, mesmo sem alterar o peso corporal, o exercício físico regular é capaz de promover melhora no metabolismo, reduzindo a glicemia, melhorando a sensibilidade à insulina e evitando a dislipidemia (CHAPUT, 2010). Durante a prática de exercícios físicos ocorre uma hiperativação do SNS, exercendo efeitos catabólicos, como a lipólise e glicogenólise. Além disso, há inibição da secreção de insulina, hormônio característico de processo anabólico (RINALDI et al., 2014; SCOMPARIN et al., 2009; GIORDANO et al., 2006). Em roedores obesos, com indução por dieta hipercalórica, a atividade física causou aumento da taxa metabólica, diminuição do processo inflamatório na área hipotalâmica (decorrente da dieta), o que pode atenuar as alterações no SNA, resultando em equilíbrio de estimulação dos ramos do sistema periférico (LAING et al., 2016).

Apesar de diversos estudos confirmarem a importância da atividade física regular para a manutenção da homeostase energética, bem como para preservar a homeostase glicêmica e conseqüentemente evitar a DM2, os efeitos do exercício físico sobre as ilhotas pancreáticas ainda são escassos e muitas vezes controversos (TSUCHIYA et al., 2013; CALEGARI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010). Entre as principais dificuldades em definir o efeito do exercício sobre a célula  $\beta$ , destaca-se o uso de diferentes protocolos de treinamento, o modelo de obesidade ou DM2 usado para avaliar seus efeitos e o modo como o metabolismo é avaliado (GUERREIRO et al., 2016). Assim, de um modo geral, é importante reconhecer que alguns efeitos mediados pela atividade física ocorrerão diretamente na célula  $\beta$  pancreática, enquanto outros efeitos serão decorrentes da melhora do metabolismo energético provocado pelo exercício físico sobre a composição corporal e sobre a sensibilidade à insulina (MOTTA et al., 2016).

Dentro deste contexto, o exercício físico crônico parece ser importante para a prevenção da exaustão das células  $\beta$ , por melhorar a sensibilidade periférica à insulina e deste modo reduzir a quantidade de insulina necessária para sustentar a homeostase glicêmica. Neste aspecto, estudos em humanos, demonstram que o exercício crônico moderado é mais efetivo na regularização do controle da secreção de insulina, do que

o exercício agudo, evitando a hiperinsulinemia. O porquê da melhor eficácia na regulação da homeostase glicêmica em exercícios moderados, ainda não é totalmente esclarecido. Parece estar envolvido a estabilização da primeira fase da secreção, sem um declínio acentuado da liberação de insulina. Já o exercício vigoroso, por aumentar a sensibilidade à insulina, pode estar acompanhado de um declínio agudo na primeira fase da secreção. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento sobre o exercício realizado e a frequência de atividade realizada (BEAUDRY; RIDDELL, 2012).

Conforme comentado anteriormente, o estado metabólico do animal é importante no perfil de resposta do pâncreas ao treinamento físico. Neste sentido, Rawal et al. (2013) conduziram estudo de exercício moderado a intenso em ratos Zucker (fa/fa) com DM2 já instalada. Os roedores realizavam corridas por até quarenta minutos ou até atingir a fadiga, cinco vezes por semana, por sete semanas consecutivas. Os animais diabéticos não apresentaram melhoras na insulinemia e na glicemia plasmáticas, porém, obtiveram uma diminuição no número de ilhotas rompidas (o qual acontece de forma frequente no rato DM2) e também uma normalização do diâmetro da ilhota, comparada aos ratos controle, além disso há um aumento de grânulos de insulina nas ilhotas exercitadas. De fato, é importante ter conhecimento sobre a fase de instalação da doença, quanto mais precoce for o início da atividade física, maior é a possibilidade da normalização da homeostase energética.

Contrariamente, Park et al. (2007) que também trabalhou com ratos diabéticos, mas nesse caso induzidos pela pancreatectomia de 90% do órgão, encontrou resultados diferentes. Nesse estudo ele uniu a dieta hiperlipídica e exercício físico moderado (corrida por vinte minutos, cinco vezes por semana, por onze semanas). O autor constatou que a dieta hiperlipídica resultou em aumento da RI periférica e que tal condição foi revertida pelo exercício físico. Além disso, a dieta hiperlipídica causou hipertrofia e neogênese nas células  $\beta$ , enquanto a atividade física aumentou o número de células secretoras de insulina por hiperplasia e por diminuição da apoptose. Portanto, enquanto a dieta hiperlipídica atenuou a primeira fase da secreção de insulina e desequilibrou a segunda fase, o exercício físico retomou a homeostase glicêmica. Segundo os autores, essa diferença pode ser explicada pela liberação de catecolaminas durante o exercício. Enquanto o exercício moderado parece ter um efeito benéfico com a diminuição da hiperinsulinemia, pela ativação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e normalização da secreção de insulina. Em alta intensidade de exercícios, ocorre um

grande aumento de catecolaminas o que pode causar diminuição da sensibilização do efeito inibidor de catecolaminas na secreção de insulina. Adicionalmente, é fundamental para que haja a melhora da secreção de insulina, que as células  $\beta$  sejam estimuladas e, principalmente, que possuam alguma capacidade secretória (DELA et al. 2004).

Já em estudo com animais obesos através de dieta de cafeteria (CAF), onde os roedores ingerem altas quantidades de gorduras e carboidratos e baixo teor de proteínas, o exercício de caminhada de alta e baixa intensidade não alterou a sensibilidade periférica à insulina e não corrigiu a hiperinsulinemia. Porém, estes animais apresentaram diminuição da adiposidade e de triglicérides circulantes (CIGARROA et al., 2016).

Yao et al. (2017) conduziram um estudo com indução de SM em roedores, através de uma dieta com alto nível de gordura por doze semanas. Após o aparecimento da desordem metabólica, os ratos foram submetidos a uma semana de intenso exercício físico, com natação por quarenta e cinco minutos diários. Posterior ao treinamento, houve uma diminuição das concentrações séricas de glicose e também de insulina. Segundo os autores, a queda das concentrações plasmáticas de insulina foi decorrente da redução do tecido adiposo. O exercício físico mostrou-se um proliferador das células  $\beta$  em ratos 90% pancreatomizados, ou seja, há uma normalização dos níveis glicêmicos, por uma compensação com o aumento do número de células produtoras de insulina, em um processo de hiperplasia. Diferente da hipertrofia, onde há o aumento do tamanho da célula para compensar a diminuição da secreção hormonal e mantém a compensação por períodos breves, a hiperplasia mantém a compensação por um período mais longo. Adicionalmente, o exercício diminui a apoptose dessas células, por ativar a cascata de sinalização insulina/IGF-I. De fato, a atividade física é um dos fatores de prevenção do desenvolvimento e progressão do estado de RI e diabetes (CHOI et al., 2006).

Considerando os achados descritos acima, é evidente o efeito modulador do exercício sobre o pâncreas, todavia, caracterizar os aspectos do controle secretor e da morfologia da célula  $\beta$  são eventos importantes no entendimento da atividade física como protetora do pâncreas endócrino.

## 5. Modelo de Obesidade induzido por glutamato monossódico – MSG

Há diversos tipos de indução de obesidade em roedores, alguns feitos pela ingestão de dietas hipercalóricas, como os grupos CAF, ratos com lesões hipotalâmicas,

tais como a lesão eletrolítica no VMH que induz a desregulação no centro de saciedade e fome promovendo hiperfagia e modelos que são submetidos a alterações gênicas, como os camundongos *ob/ob* e ratos *Zucker (fa/fa)* (CIGARROA et al., 2016; RAWAL et al., 2013; LINDSTRÖM et al., 2007; GAUTAM et al., 2006). Dentre os modelos de obesidade caracterizados como hipotalâmico está a obesidade induzida pelo tratamento neonatal com MSG (GRASSIOLLI et al., 2006). Existem protocolos diversos de aplicação de MSG, sendo comumente utilizada a aplicação de injeções subcutâneas dessa solução nos primeiros cinco dias de vida dos filhotes (OLNEY, 1969). Essa técnica leva a uma massiva destruição do núcleo arqueado do hipotálamo (ARQ), que resulta em uma desregulação do metabolismo energético e endócrino; conseqüentemente há o desenvolvimento de obesidade, disfunção sexual e deficiência de hormônio de crescimento (GH) (ELFERS; RALSTON; ROTH, 2011; SCOMPARIN et al., 2009; TORREZAN et al., 2006).

A obesidade no rato MSG não está relacionada ao desequilíbrio do consumo alimentar, visto que estes animais são normofágicos ou hipofágicos. O excesso de tecido adiposo neste modelo é decorrente do desequilíbrio da atividade do SNA, resultado da lesão do ARQ (SCOMPARIN et al., 2009). Neste modelo observa-se redução da atividade do SNS, associada à hiperatividade do SNP (KARLEN-AMARANTE et al., 2012). Em estudo, Lubaczeuski et al. (2015) realizaram vagotomia subdiafragmática aos 30 dias de vida em ratos MSG, que não desenvolveram hiperinsulinemia, intolerância à glicose e reduziram o seu teor de tecido adiposo. Adicionalmente, sabe-se que a hiperatividade vagal promove aumento no número de células  $\beta$  na ilhota, o que foi inibido com a realização da vagotomia em idade precoce.

Além da vagotomia, o próprio exercício físico pode melhorar as condições bioquímicas e biométricas de camundongos MSG-obesos. Estudo conduzido por Andreazzi et al. (2009) comprovou que o exercício físico apesar de leve intensidade, natação por cerca de quinze minutos, três vezes por semana, por oito semanas; realizado em animais MSG ainda muito jovens (cerca de trinta dias de vida), evitam a instalação do quadro de hiperinsulinemia. Adicionalmente, há redução da massa adiposa quando comparado a animais MSG não exercitados. Tal achado pode estar relacionado à diminuição da secreção de insulina, já que o aumento do tecido adiposo é considerado um dos principais fatores para o aumento da secreção de insulina.

Scomparin et al. (2009) demonstraram em seu trabalho, que em camundongos, MSG-obesos apresentam desequilíbrio no SNA, com hiperatividade vagal. De acordo com o estudo, essa hiperatividade favorece um aumento na glicemia e uma hipersecreção de insulina ocasionado por alta estimulação das células  $\beta$  pancreáticas. Segundo os autores, esta hiperinsulinemia favorece a lipogênese, portanto, a expansão excessiva do tecido adiposo explicando a obesidade MSG.

Um resultado benéfico do exercício físico também foi encontrado pelo estudo de Leite et al. (2013) em roedores MSG que nadaram 30 minutos, três vezes por semana ao longo da vida. Ratos MSG exercitados apresentaram redução da hipertrofia da ilhota e do adipócito, o que foi acompanhado de diminuição da secreção de insulina induzida pela glicose. Além disso, o estudo demonstrou que ilhotas pancreáticas de animais MSG apresentam aumento na expressão do transportador GLUT-2, um evento normalizado em ilhotas de ratos MSG exercitados.

Conforme comentado anteriormente, o desajuste na atividade autonômica é um evento importante na obesidade induzida pelo MSG. Dentro deste contexto a hiperatividade vagal, modifica a ação colinérgica no pâncreas endócrino. Ilhotas pancreáticas obtidas de roedores MSG obesos são menos responsivas ao estímulo de ACH (GRASSIOLLI; GRAVENA; MATHIAS, 2007). Todavia durante muitos anos esta hipótese não havia sido explorada molecularmente neste modelo de obesidade. Porém, em 2013 e 2014 dois estudos em ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos encontraram diferentes explicações moleculares para o fenômeno da reduzida responsividade à ACH.

Segundo Ribeiro et al. (2013) ilhotas pancreáticas isoladas de ratos MSG apresentam reduzido efeito colinérgico, pois a hiperatividade vagal promove “down-regulation” do RM3. Neste estudo, os autores mostraram que a expressão do RM3 está reduzida, bem como, as cascatas de sinalização acionadas pelo receptor em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos MSG obesos adultos.

Todavia, resultados contrários foram obtidos por Miranda et al. (2014). Segundo os autores, a expressão do RM3 está aumentada nas ilhotas de ratos MSG-obesos, apesar disso o efeito colinérgico continua reduzido por que outros subtipos de RM, com ação antagônica ao RM3 estão alterados. Eles demonstraram que ilhotas pancreáticas de ratos MSG apresentam maior expressão RM2, o qual tem efeito inibitório sobre a secreção de insulina. Este achado confirma resultados obtidos por Grassioli et al.

(2007), mostrando farmacologicamente que a ação inibitória do RM2 é elevada em ilhotas pancreáticas de ratos MSG. A presença de um efeito inibitório mediado pelo M2 sobre a secreção de insulina já havia sido demonstrada por Miguel et al. (2002) em linhagem tumoral secretora de insulina (BRINBD11).

Deste modo, ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos apresentam alterada resposta a glicose, reduzido efeito insulínico colinérgico e mudanças na morfologia pancreática que podem ser moduladas pela prática regular de exercício. Até o presente momento não há nenhum estudo avaliando como ilhotas pancreáticas de roedores obesos MSG respondem ao treinamento físico, em particular ao estímulo colinérgico.

## REFERÊNCIAS

- AHRÉN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, p. 393 – 410, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819232>>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p, 2002. Disponível em: <<http://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- ANDREAZZI, A. E.; SCOMPARIN, D. X.; MESQUITA, F. P.; BALBO, S. L.; GRAVENA, C.; DE OLIVEIRA, J. C.; RINALDI, W.; GARCIA, R. M. G.; GRASSIOLLI, S.; MATHIAS, P. C. F. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 201, p. 351 – 359, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297408>>. Acesso em: 19 maio 2016.
- BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators Of Inflammation**, v. 2010, p.1-19, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20671929>>. Acesso em: 03 jul. 2016.
- BEAUDRY, J. L.; RIDDELL, M. C. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic  $\beta$ -cell function and diabetes development. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, p. 560 – 573, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556149>>. Acesso em: 26 abr. 2017.
- BOADA, C. A. C.; MARTÍNEZ-MORENO, J. M. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo “insulin resistance-secretion déficit”. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 2, p. 78 – 87, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23834050>>. Acesso em: 05 jul. 2016.
- BOSCHERO, A. C.; SZPAK-GLASMAN, M.; CARNEIRO, E. M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E.; ATWATER, I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 336 – 342, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7864111>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- BRASIL. **Vigitel Brasil 2016**, Ministério da Saúde, Brasília, 2016. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/vigitel.pdf>>. Acesso em: 29 maio 2017.
- BRYAN, J.; VILA-CARRILES, W. H.; ZHAO, G.; BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L. Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. **Diabetes**, v. 53, s. 3, p. S104 – S112, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561897>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

- BYERS, M. S.; HOWARD, C.; WANG, X. Avian and mammalian facilitative glucose transporters. **Microarrays**, v. 6, n. 7, p. 1 – 15, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28379195>>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- CALEGARI, V. C.; ABRANTES, J. L.; SILVEIRA, L. R.; PAULA, F. M.; COSTA, J. M.; RAFACHO, A.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E. M.; BOSQUEIRO, J. R.; BOSCHERO, A. C.; ZOPPI, C. C. Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 711 – 718, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174407>>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- CIGARROA, I.; LALANZA, J. F.; CAIMARI, A.; BAS, J. M. B.; CAPDEVILA, L.; AROLA, L.; ESCORIHUELA, R. M. Treadmill intervention attenuates the cafeteria diet-induced impairment of stress-coping strategies in young adult female rats. **Journal Plos One**, v.11, n. 4, p. 1 – 17, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839746/>>. Acesso em: 29 abr. 2017.
- CERF, M. E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 1, p. RA12 – RA17. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179917>>. Acesso em: 07 abr. 2017.
- CHAPUT, J.; KLINGENBERG, L.; ROSENKILDE, M.; GILBERT, J.; TREMBLAY, A.; SJÖDIN, A. Physical activity plays an important role in body weight regulation. **Journal of Obesity**, v. 2011, p. 1 – 11, jun. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931400/>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- CHOI, S. B.; JANG, J. S.; HONG, S. M.; JUN, D. W.; PARK, S. Exercise and dexamethasone oppositely modulate b-cell function and survival via independent pathways in 90% pancreatectomized rats. **Journal of Endocrinology**, v. 190, p. 471 – 482, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899580>>. Acesso em 09 jun. 2017.
- CLARK, P. B.; KAVANAGH, K.; GAGE, H. D.; GARG, P.; GARG, S.; CALLES-ESCANDON, J.; WAGNER, J. D.; MORTON, K. Enhanced cholinergic response in pancreata of nonhuman primates with impaired glucose tolerance shown on [<sup>18</sup>F]Fluorobenzyltrozamicol positron emission tomography. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 11, n. 7, p. 451 – 455, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2902232/>>. Acesso em: 07 abr. 2017.
- CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.; JÖRNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell death in type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, s. 2, p. 97 – 107, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306347>>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- DEBUYSER, A.; DREWS, G.; HENQUIN, J. The influence of temperature on the effects of acetylcholine and adrenaline on the membrane potential and <sup>86</sup>Rb efflux in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. **Experimental Physiology**, v. 76, p. 553 – 559, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1910762>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

DELA, F.; LINSTOW, M. E.; MIKINES, K. J. GALBO, H. Physical training may enhance  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 287, p. 1024 – 1031, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251867>>. Acesso em: 28 abr. 2017.

DOLIBA, N. M.; QIN, W.; VATAMANIUK, M. Z.; BUETTGER, C. W.; COLLINS, H. W.; MAGNUSON, M. A.; KAESTNER, K. H.; WILSON, D. F.; CARR, R. C.; MATSCHINSKY, F. M. Cholinergic regulation of fuel-induced hormone secretion and respiration of SUR1<sup>-/-</sup> mouse islets. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. 525 – 535, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16638820>>. Acesso: 07 abr. 2017.

ELFERS, C.; RALSTON, M.; ROTH, C L. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. **Journal Of Pediatric Endocrinology And Metabolism**, v. 24, n. 3 – 4, p. 131 – 137, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21648279>>. Acesso em: 06 maio 2016.

GAUTAM, D.; HAN, S. J.; DUTTARROY, A.; MEARS, D.; HAMDAN, F. F.; LI, J. H.; CUI, Y.; JEON, J.; WESS, J. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in b-cell function and glucose homeostasis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, s. 2, p. 158 – 169, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919190>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

GEMBAL, M.; GILON, P.; HENQUIN, J. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse  $\beta$  cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, p. 1288 – 1295, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442990/>>. Acesso em: 29 maio 2017.

GILON, P.; HENQUIN, J. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic -Cell Function. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 5, p. 565 – 604, jan. 2001. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/edrv.22.5.0440>>. Acesso em: 15 maio 2016.

GOMES, R. M.; TÓFOLO, L. P.; RINALDI, W.; SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; BARRELA, L. F.; OLIVEIRA, J. C.; BRANCO, R. C. S.; AGOSTINHO, A. R.; RIBEIRO, T. A. S.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F. Moderate exercise restores pancreatic beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 310 – 321, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942282>>. Acesso em: 30 maio 2017.

GRASSIOLLI, S.; BONFLEUR, M. L.; SCOMPARIN, D. X.; MATHIAS, P. C. F. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K<sup>+</sup>ATP channel dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, v. 30, n. 2, p. 191 – 196, 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1385%2FENDO%3A30%3A2%3A191?LI=true>>. Acesso em: 30 maio 2017.

GRASSIOLLI, S.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F. Muscarinic M2 receptor is active

on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, p. 223 – 228, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174301>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

GUERREIRO, L. F.; ROCHA, A. M.; MARTINS, C. N.; RIBEIRO, J. P.; WALLY, C.; STRIEDER, D. L.; CARISSIMI, C. G.; OLIVEIRA, M. G.; PEREIRA, A. A.; BIONDI, H. S.; MONSERRAT, J. M.; GONÇALVES, C. A. N. Oxidative status of the myocardium in response to different intensities of physical training. **Physiological Research**, v. 65, 737 – 749, 2016. Disponível em: <[http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/65/65\\_737.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/65/65_737.pdf)>. Acesso em: 03 jun, 2017.

GUSTAFSON, B.; HEDJAZIFAR, S.; GOGG, S.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193-200, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276015000107>>. Acesso em: 07 jul. 2016.

HABER, E.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302001000300003&script=sci\\_abstract&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302001000300003&script=sci_abstract&lng=pt)>. Acesso em: 10 jul. 2016.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 52, p. 739 – 751, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288076>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751 – 1760, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078440>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

HENQUIN, J. C.; DUFRANE, D.; NENQUIN, M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. **Diabetes**, v. 55, p. 3470 – 3477, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130494>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

HENQUIN, J. C.; RAVIER, M. A.; NENQUIN, M.; JONAS, J. C.; GILON, P. Hierarchy of the  $\beta$ -cell signals controlling insulin secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 742 – 750, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925032>>. Acesso em: 21 jun 2017.

HIRKO, K. A.; KANTOR, E. D.; COHEN, S. S.; BLOT, W. J.; STAMPLER, M. J.; SIGNORELLO, L. B. Body mass index in young adulthood, obesity trajectory, and premature mortality. **American Journal of Epidemiology Advance**, v. 182, n. 5, p. 441 – 450, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977515>>. Acesso em: 02 jul. 2016.

KARLEN-AMARANTE, M.; CUNHA, N. V.; ANDRADE, O.; SOUZA, H. C. D.; MARTINS-PINGE, M. C. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 61, p. 1435 – 1442, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554831>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

KIBA, T.; TANAKA, K.; NUMATA, K.; HOSHINO, M.; MISUGI, K.; INOUE, S. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. **Gastroenterology**, v. 110, p. 885 – 893, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608899>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

LAING, B. T.; DO, K.; MATSUBARA, T.; WERT, D. W.; AVERY, M. J.; LANGDON, E. M.; ZHENG, D.; HUANG, H. Voluntary exercise improves hypothalamic and metabolic function in obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 2, p. 109 – 122, maio 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26931136>>. Acesso em: 09 jul 2016.

LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [*ob/ob* mice]. **The Scientific World JOURNAL**, v. 7, p. 666 – 685, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17619751>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

LEITE, N. C.; FERREIRA, T. R.; RICKLI, S.; BORCK, P. C.; MATHIAS, P. C. F.; EMILIO, H. R. O.; GRASSIOLLI, S. Glycolytic and mitochondrial metabolism in pancreatic islets from MSG-treated obese rats subjected to swimming training. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 242 – 256, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466813>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

LUBACZEUSKI, C.; BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; VETTORAZZI, J. F.; SANTOS-SILVA, J. C.; CARNEIRO, E. M.; BONFLEUR, M. L. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 447 – 457, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714886>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

MATHIAS, P. C. F.; TORREZAN, R.; GRASSIOLLI, S. Controle autonômico da secreção de insulina: saúde e doença. **Endocrinologia & Diabetes: Clínica e Experimental**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 1027-1032, 2009. Disponível em: <<http://www.revistaendocrino.com/page2.html>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

MATTARAIA, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1490 – 1496, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v42n8/a21312cr5598.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

MENEZES, M. C.; LOPES, A. C. S.; CUNHA, L. P.; JANSEN, A. K.; SANTOS, L. C. An optimal method for measuring body fat in overweight individuals in clinical practice. **Endocrinology & Metabolic Syndrome**, v. S2, n. 002, p. 1 – 5. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/an-optimal-method-for-measuring-body-fat-in-overweight-individuals-in-clinical-practice-2161-1017.S2-002.pdf>>. Acesso em: 03 out 2016.

MIGUEL, J. C.; ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; MATHIAS, P. C. F.; FLATT, P. R. Muscarinic receptor subtypes mediate stimulatory and paradoxical inhibitory effects on an insulin-secreting  $\beta$  cell line. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 45 – 50, 2002. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/profile/Peter\\_Flatt/publication/11507554\\_Muscarinic\\_receptor\\_subtypes\\_mediate\\_stimulatory\\_and\\_paradoxical\\_inhibitory\\_effects\\_on\\_an\\_insulin-secreting\\_beta\\_cell\\_line/links/55f1453608ae0af8ee1d51b7/Muscarinic-receptor-subtypes-mediate-stimulatory-and-paradoxical-inhibitory-effects-on-an-insulin-secreting-beta-cell-line.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Peter_Flatt/publication/11507554_Muscarinic_receptor_subtypes_mediate_stimulatory_and_paradoxical_inhibitory_effects_on_an_insulin-secreting_beta_cell_line/links/55f1453608ae0af8ee1d51b7/Muscarinic-receptor-subtypes-mediate-stimulatory-and-paradoxical-inhibitory-effects-on-an-insulin-secreting-beta-cell-line.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2017.

MIRANDA, R. A.; AGOSTINHO, A. R.; TREVENZOLI, I. H.; BARELLA, L. F.; FRANCO, C. C. S.; TROMBINI, A. B.; MALTA, A.; GRAVENA, C.; TORREZAN, R.; MATHIAS, P. C. F.; OLIVEIRA, J. C. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.33, p. 1075 – 1083, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732778>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

MOTTA, V. F.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 56, p. 655 – 663, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27285355>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

OLIVEIRA, C. A. M.; PAIVA, M. F.; MOTA, C. A. S.; RIBEIRO, C.; LEME, J. A. C. A.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. **Islets**, v. 2, n. 4, p. 240 – 246, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099318>>. Acesso em 03 jun. 2017.

OLNEY, J. M. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719 – 721, maio 1969. Disponível em: <[https://www.ganino.com/games/Science/science%20magazine%201968-1969/root/data/Science%201968-1969/pdf/1969\\_v164\\_n3880/1726016.pdf](https://www.ganino.com/games/Science/science%20magazine%201968-1969/root/data/Science%201968-1969/pdf/1969_v164_n3880/1726016.pdf)>. Acesso em: 18 ago. 2016.

PANG, G.; XIE, J.; CHEN, Q.; HU, Z. Energy intake, metabolic homeostasis, and human health. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 89 – 103, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2897177/>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

PARK, S.; HONG, S. M.; LEE, J. E.; SUNG, S. R. Exercise improves glucose homeostasis that has been impaired by a high-fat diet by potentiating pancreatic  $\beta$ -cell function and mass through IRS2 in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 1764 – 1771, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761790>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

PICK, A.; CLARK, J.; KUBSTRUP, C.; LEVISETTI, M.; PUGH, W.; BONNER-WEIR, S.; POLONSKY, K. S. Role of apoptosis in failure of  $\beta$ -cell mass compensation for insulin resistance and  $\beta$ -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v. 47, p. 358 – 364, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519740>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

RAWAL, S.; HUANG, H.; NOVIKOVA, L.; HAMED, T.; SMIRNOVA, I. V.; STEHNO-BITTEL, L. Effect of exercise on pancreatic islets in Zucker diabetic fatty rats. **Journal**

of **Diabetes and Metabolism**, v. S10, n. 007, p. 1 – 7, 2013. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/effect-of-exercise-on-pancreatic-islets-in-zucker-diabetic-fatty-rats-2155-6156.S10-007.php?aid=15693>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

REAVEN, G. M. Role of Insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595 – 1607, 1988. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056758?dopt=Abstract>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

RINALDI, W.; GOMES, R. M.; SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, T. A.; FABRICIO, G. S.; BARELLA, L. F.; PAVANELLO, A.; TROMBINI, A. B.; MATHIAS, P. C. F.; OLIVEIRA, J. C. Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 25, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4049453/>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

RIBEIRO, R. A.; BALBO, S. L.; ROMA, L. P.; CAMARGO, R. L.; BARELLA, L. F.; VANZELA, E. C.; MATHIAS, P. C. F.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; BONFLEUR, M. L. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 4521 – 4528, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652999>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

ROTHMAN, K J. BMI-related errors in the measurement of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 56 – 59, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695655>>. Acesso em: 02 jul. 2016.

RUDKOWSKA, I. Functional foods for health: Focus on diabetes. **Maturitas**, v. 62, p. 263 – 269, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233576>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

RUTTER, G. A.; PULLEN, T. J.; HODSON, D. J.; MARTINEZ-SANCHEZ, A. Pancreatic  $\beta$ -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion, v. 466, p. 203 – 218, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697093>>. Acesso em: 07 jul. 2016.

SATO, Y.; AIZAMA, T.; KOMATSU, M.; OKADA, N.; YAMADA, T. Dual functional role of membrane depolarization/ $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat pancreatic  $\beta$ -cell. **Diabetes**, v. 41, p. 438 – 443, 1992. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/41/4/438>>. Acesso em: 31 maio 2017.

SCHÖFL, C.; BÖRGER, J.; LANGE, S.; MÜHLEN, A. V. Z.; BRABANT, G. Energetic Requirement of Carbachol-Induced  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling in Single Mouse  $\beta$ -Cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4065 – 4071, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.141.11.7741>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

SCOMPARIN, D. X.; GOMES, R. M.; GRASSIOLLI, S.; RINALDI, W.; MARTINS, A. G.; OLIVEIRA, J. C.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F. Autonomic activity and glycemic

homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510 – 517, out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856134>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

SOUZA, G. E. S.; PRUDENCIATTO, M. R.; TANAKA, R. S.; MARTELLI, A.; DELBIN, L. R. Exercícios físicos como ferramenta de enfrentamento às comorbidades associadas à obesidade: revisão da literatura. **Archives Of Health Investigation**, v. 5, n. 2, p. 112 – 119, maio 2016. Disponível em: <<http://www.archhealthinvestigation.com.br/index.php/ArcHI/article/view/1307>>. Acesso em: 02 jul. 2016.

STRAUB, S. G.; JAMES, R. F. L.; DUNNE, M. J.; SHARP, G. W. G. Glucose Activates both  $K_{ATP}$  channel-dependent and  $K_{ATP}$  channel-independent signaling pathways in human islets. **Diabetes**, v. 47, p. 758 – 763, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588447>>. Acesso em: 31 maio 2017.

TORREZAN, R.; GRASSIOLLI, S.; BRITO, N. A.; MATHIAS, P. C. F. Glycogenolysis response to adrenergic agonists in the liver of rats treated with monosodium glutamate (MSG). **Acta Scientiarum: Health Sciences**, Maringá, v. 28, n. 2, p.175-179, 20 nov. 2006. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/download/1103/553>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

TSUCHIYA, M.; MANABE, Y.; YAMADA, K.; FURUICHI, Y.; HOSAKA, M.; FUJII, N. L. Chronic exercise enhances insulin secretion ability of pancreatic islets without change in insulin content in non-diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 676 – 682, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211597>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, p. 19 – 39, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

YAO, L.; WEI, J.; SHI, S.; GUO, K.; WANG, X.; WANG, Q.; CHEN, D.; LI, W. Modified lingguizhugan decoction incorporated with dietary restriction and exercise ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and hypertension in a rat model of the metabolic syndrome. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 132, p. 1 – 12, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28241808>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

**SWIMMING TRAINING REDUCES GLUCOSE-AMPLIFYING  
PATHWAY AND CHOLINERGIC RESPONSES IN ISLETS FROM  
LEAN- AND MSG-OBESE RATS**

**Swimming training reduces glucose-amplifying pathway and cholinergic responses in islets from lean- and MSG-obese rats**

Ana C Valcanaia<sup>1</sup>, Patricia C Borck\*<sup>2</sup>, Nayara de C Leite\*<sup>2</sup>, Sarah Rickli<sup>2</sup>, Jessica C de L Alípio<sup>3</sup>, Michael Machado<sup>3</sup>, Jose C. Velloso<sup>4</sup>, Paulo C de F Mathias<sup>5</sup>, Antonio C Boschero<sup>2</sup>, Sabrina Grassioli<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Biologica Science and Health Center, University of West Parana (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.*

*<sup>2</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.*

*<sup>3</sup>Department of Nursing, University of Ponta Grossa/UEPG, Ponta Grossa, PR, Brazil.*

*<sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Ponta Grossa/UEPG, Ponta Grossa, PR, Brazil.*

*<sup>5</sup>Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology; University of Maringá/UEM, Maringa, PR, Brazil.*

*\*These authors contributed equally to this work*

**Correspondence should be addressed to:** Ana Claudia Valcanaia. Address: Tom Jobim Street, number 370. Cascavel-PR, Brazil; Telephone 55 45 999067953; email address: [annavalcanaia@gmail.com](mailto:annavalcanaia@gmail.com).

**Abstract:**

Here, we investigated the effects of exercise training on glucose- and cholinergic-

induced insulin secretion in pancreatic islets, isolated from obese and lean rats. Obese rats were obtained by the treatment of male Wistar rats with monosodium glutamate (MSG; 4g/Kg) for the first 5 days of life, while control (CON) rats received saline. At 21 days of life, the rats were divided in exercised (EXE) and sedentary (SED); which did not were submitted to physical training. The EXE rats were swan 30 min 3 times/week, for 10 weeks. The white adipose tissue, insulinemia and lipidemia were lower in MSG-EXE, compared to MSG-SED rats. Swimming training also diminished glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and reduced the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-independent pathway in pancreatic islets from CON-EXE and MSG-EXE rats, compared to the respective SED groups. In pancreatic islets from EXE groups was observed accentuated reduction in cholinergic insulinotropic effect without alter muscarinic receptor 3 (M3R) expression and their downstream pathways. In conclusion, swimming training reduces GSIS and cholinergic responsiveness in isolated pancreatic from lean and hypothalamic obese rats; events that could be related with inhibition of glucose amplifying pathways.

**Keywords:** Acetylcholine, glucose metabolism, insulin secretion, obesity, swimming training

### **Introduction:**

Pancreatic beta cells are specialized cells that synthesize and secrete insulin; events directly modulated by variations in the concentrations of nutrient in blood, in especial glucose. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) occurs via two primary pathways (triggering and amplifying) which require glucose metabolism<sup>1,2</sup>. In the triggering pathway, an increase in the ATP/ADP ratio closes the ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels, located at the beta cell plasma membrane. The reduction in K<sup>+</sup> efflux depolarizes the membrane and opens the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, resulting in Ca<sup>2+</sup> influx into the cells, and the increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> provokes exocytosis of the insulin-containing granules<sup>3,4</sup>. The glucose amplifying pathways is independent of the closure of K<sub>ATP</sub> channels and seems to be related with mechanisms termed Ca<sup>2+</sup> supremacy<sup>5-7</sup>.

GSIS is potentiated by several agents, including the neurotransmitter, acetylcholine (ACh)<sup>8</sup>. ACh is released by cholinergic terminals from vagal fibers, close to the islet cells,<sup>9</sup> binds to muscarinic receptor subtype 3 (M3R), located at the beta cells plasma membrane<sup>10,11</sup>, and activates phospholipase C (PLC), which produces diacylglycerol (DAG) and inositol-3-phosphate (IP3). DAG, in turn, promotes the activation of protein kinase C (PKC), which increases the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling upon the exocytosis of insulin-containing granules, while IP3 stimulates Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum<sup>12,13</sup>.

Over the last two decades, obesity has become one important health problem, affecting millions of people worldwide<sup>14</sup>. Several metabolic disorders are associated with excessive content of adipose tissue including glucose intolerance, insulin resistance, dyslipidemia, and hypertension, all of which are collectively termed as Metabolic Syndrome (MS). Both MS and type 2 diabetes (T2D) are associated with pancreatic beta cell dysfunctions, including altered glucose-induced insulin secretion and changes in insulinotropic cholinergic action<sup>15-17</sup>.

Regular physical exercise is an effective strategy to improve glucose homeostasis in healthy, obese and diabetic individuals, because chronic exercise improves insulin sensitivity<sup>18-20</sup>. However, conflicting results have been reported regarding the effects of chronic exercise on pancreatic beta cell function<sup>21-24</sup>. In addition, the effects of exercise on glucose-induced triggering and amplifying pathways as well as the insulinotropic cholinergic response, in pancreatic islets from healthy, obese, and diabetic rodents, are unclear.

The administration of high doses of monosodium glutamate (MSG) to rodents, during the neonatal period promotes damage in hypothalamic arcuate nucleus (ARC), culminating in the development of obesity in adult life<sup>25-27</sup>. MSG-induced obesity is

characterize by increased adiposity, pancreatic islet dysfunction, glucose intolerance, insulin resistance, dyslipidemia, and cardiovascular alterations, reproducing many of abnormalities present in humans obese with MS<sup>28,29,30</sup>. Interestingly, in MSG-obese rats autonomic imbalance is directly involved in insulin hypersecretion as well as, in massive white adipose tissue<sup>30</sup>. Here, we investigate if swimming training alters glucose - and cholinergic - induced insulin secretion, in pancreatic islets isolated from lean and MSG-obese rats.

## **Results:**

The effects of swimming training and obesity in body weight and biochemical blood profile of rats are shown in Table 1. Neonatal MSG treatment increased the retroperitoneal fat depot, promoting hyperglycemia, hyperinsulinemia, and increased triglyceride plasmatic levels compared to CON-SED rats ( $p < 0.05$ ). Swimming training reduced white adipose tissue content and normalized metabolic parameters. Thus, MSG-EXE animals presented reduction in body weight and retroperitoneal fat content in relation to MSG-SED rats. Moreover, chronic swimming training was effective in reestablishes glycemia, insulinemia, and triglyceridemia in MSG-SED group compared to those of MSG-SED rats ( $p < 0.05$ ). In body weight and retroperitoneal fat depot was observed isolate effect of exercise ( $F(1,43) = 5.40$  and  $F(1,55) = 7.61$ , respectively) and MSG treatment ( $F(1,43) = 16.16$  and  $F(1,55) = 81.18$ , respectively). However, in plasmatic levels of glucose ( $F(1,45) = 8.93$ ), insulin ( $F(1,47) = 21.91$ ) and triglycerides ( $F(1,32) = 9.141$ ) are observed significantly interaction effect.

Figure 1 shows the glucose dose-response curve in isolated pancreatic islets. GSIS was significantly influenced by MSG ( $F(1,76) = 11.62$ ) and EXE ( $F(1,76) = 15.58$ ) as well as by interaction effects ( $F(1,76) = 7.39$ ). Thus, islets from the MSG-SED group

showed a higher  $EC_{50}$  in relation than islets from CON-SED rats ( $p < 0.05$ ). Swimming training reduced GSIS increased glucose sensibility in islets from obese group. Thus, islets from MSG-EXE rats presented reduced  $EC_{50}$  in relation to islets from MSG-SED rats.

The impact of swimming training on the cholinergic dose-response curve from isolated pancreatic islets is shown in Figure 2. Due the marked reduction in cholinergic response found in islets from MSG-SED as well as in exercised groups, we were unable to calculate the  $EC_{50}$  to Ach dose- response curve. Thus, the insulinotropic effects of Ach in several concentrations (1 - 3000 $\mu$ M) was expressed as percentages, taking the insulin secretion at 8.3 mM glucose as reference (100%), for all groups. Pancreatic islets from CON-SED rats secreted insulin to increasing concentration of Ach in a characteristic S shape curve. Thus, the addition of Ach in high concentration provokes a rise of 400% in glucose-induce insulin secretion. Despite, in islets from MSG-SED rats, maximal insulin release, also have been obtained at highest concentrations of Ach the percentage of insulinotropic effect was smaller reaching only 150%. The dose-response curve to Ach was shifted to the right in islets from both exercised groups suggesting reduction in Ach sensibility (Figure 2A). Neither swimming training nor MSG treatment affected significantly M3R, PKC and PKA expressions in isolated pancreatic islets.

The impact of swimming training in trigger and amplifying pathways is presented in Figure 3. At 16.7 mM glucose, depolarizing concentrations of KCl (30 mM) potentiated the insulin secretion, in a lesser extent, in islets from CON-EXE than in islets of CON-SED ( $p < 0.05$ ). However, in the presence of the  $K_{ATP}$  channel blocker, diazoxide (Dz), the inhibition of insulin secretion was higher in CON-EXE, compared to CON-SED islets ( $p < 0.05$ ). In the presence of high KCl and Dz the potencialization of secretion was 100% higher in islets from CON-SED rats, confirming the presence of amplifying pathways.

However, this pathway was absent in CON-EXE islets (Figure 3A). The depolarizing effect of KCl (30 mM) as well as, the inhibitory effect of Dz were similar in islets from MSG-SED and MSG-EXE (figure 3B). The amplifying pathways was absent in islets from MSG-SED rats. Interestingly, in islets from, MSG-EXE group, the KCL plus Dz (amplifying pathways) provoked significantly inhibitory effect on insulin secretion compared to MSG-SED islets ( $p < 0.05$ ; Figure 3B).

We also evaluated insulin secretion in response to  $Ca^{2+}$  channel blockers (Figure 4). The L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker, Verapamil (10 $\mu$ M - VR), had similar inhibitory effects on GSIS in islets from all experimental groups. The addition of Thapsigargin (1 $\mu$ M – THP), an inhibitor of the ER  $Ca^{2+}$ -ATPase, reduced GSIS by 4% in islets from CON-SED rats and 29%, in islets from the MSG-SED group ( $p < 0.05$ ). Swimming training did not alter the THP or VR responses in islets from the exercised groups. The association VR + THP promoted similar inhibitory effect in GSIS in all experimental groups.

## Discussion

It is well established that MSG administered in high dose during neonatal period to provoke lesions in hypothalamic ARC nucleus, leading to massive adipose tissue accumulation, insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia, as well as pancreatic dysfunctions in adult life<sup>30,31</sup>. Exercise activates sympathetic flux to periphery tissues and, via adrenergic action promotes fat mobilization and reduces insulin secretion from endocrine pancreas<sup>32,33</sup>. Moreover exercise improves lipid and glucose metabolism<sup>33</sup>, in particular, by to correct insulin sensibility<sup>32</sup>. In the present study, we observed that a moderate protocol of swimming training maintained at long of life was efficiently in attenuates obesity, normalizing plasmatic glucose and triglycerides levels, besides to prevent hyperinsulinemia. The sympathetic hypoactivity characteristics of MSG obese

rodents appear be attenuated by physical training<sup>24,33</sup>.

Alterations in GSIS, in association with changes in cholinergic responses, were observed in pancreatic islets from obese rodents or obese subjects<sup>34,35</sup>. The mechanisms underpinning GSIS from pancreatic islets comprise both initiation (trigger) and amplification pathways<sup>36</sup>. In the present study, pancreatic islets, isolated from MSG-obese rats, present reduced glucose sensibility, event that could be relate to absence of glucose amplifying pathways found in our data and also observed by other authors<sup>11,31</sup>. Recently study published by Grespan et al.<sup>37</sup> showed that beta cells dysfunction in T2D can be explained by an impaired amplifying pathway. Moreover, pancreatic islets, isolated from MSG-obese rats, display reduced Ach-induced insulinotropic effect which, presumably, depends on the Ach-M3R-activated pathway<sup>11</sup>. According study of Ruiz de Azua et al.<sup>38</sup> M3R receptors and their downstream pathways, such as, PKC activity play a key role in maintaining insulin release and glucose homeostasis. However, neither M3R nor PKC protein were significantly affect by MSG treatment; contrary results were obtained by other studies<sup>35,39</sup>. There are not clear explanations for such a discrepancy.

In our study, swimming training induced increase in glucose sensibility and inhibition in cholinergic responses without changes in M3R or their downstream pathways. The effects of exercise in endocrine pancreas are contradictories<sup>24,40,41</sup>. We have previously demonstrated that islets from MSG exercised rats present reduction in GSIS, an event associated with reduction in islets size and changes in mitochondrial flux<sup>24</sup>. In contrast, islets from lean trained rats, submitted to a single acute exercise, secreted more insulin when stimulated by the cholinergic agent, carbachol<sup>42</sup>. Ribeiro et al.<sup>41</sup> using identical protocol training showed that islets from MSG exercised had reduced GSIS and have higher carbachol insulinotropic response with higher epinephrine inhibition. In contrast, islets from lean trained rats, submitted to a single acute exercise,

secreted more insulin when stimulated by the cholinergic agent, carbachol<sup>42</sup>. On the first time, we demonstrated that chronic exercise training can reduce GIIIS for inhibiting amplifying pathways in islets from both lean and MSG-obese groups.

Glucose metabolism, coupled with changes in  $Ca^{2+}$  flux, play a key role in both the triggering and amplifying pathways, as well as in cholinergic responses<sup>43,44</sup>. Altered  $Ca^{2+}$  homeostasis is associated with dysfunctions in the beta cells, in diabetic humans and obese rodents<sup>45,46</sup>. It is also shown that physical activity improves islet sensitivity to  $Ca^{2+}$  in lean rats, and improves abnormal  $Ca^{2+}$  signaling in diabetic rats, with cardiovascular dysfunction<sup>44</sup>. We also observed that the inhibitory actions of VR and THP on GSIS were similar in islets from exercised and sedentary rats. These findings suggest that the alterations in glucose and cholinergic responses, observed in islets from exercised groups, are independent on changes in  $Ca^{2+}$  influx or  $Ca^{2+}$  mobilization from the ER. However, these results do not exclude the possibility that the efficacy of  $Ca^{2+}$  in the amplifying pathway could be altered by exercise training, since we found that exercise reduced this pathway in isolated pancreatic islets. However, we postulated that the inoperating amplifying pathways present in islets from MSG-SED and also in MSG-EXE rats also could reduce cholinergic response without alter M3R pathways. Moreover, as suggested by Miranda et al.<sup>35</sup> alterations in MR composition could not be discharged.

In conclusion, chronic swimming training attenuated obesity, prevented hyperinsulinemia and dyslipidemia, reducing GSIS and increasing glucose sensibility in pancreatic islets from lean and MSG-obese rats. The potent inhibitory effect of exercise in glucose-amplifying pathway could explain smaller glucose responsiveness and absence of cholinergic insulinotropic action. These functional adjustments in insulin secretion, induced by physical training, could represent an important mechanism for the preservation of pancreatic beta cell function.

## **Material and Methods:**

### *1. Reagents:*

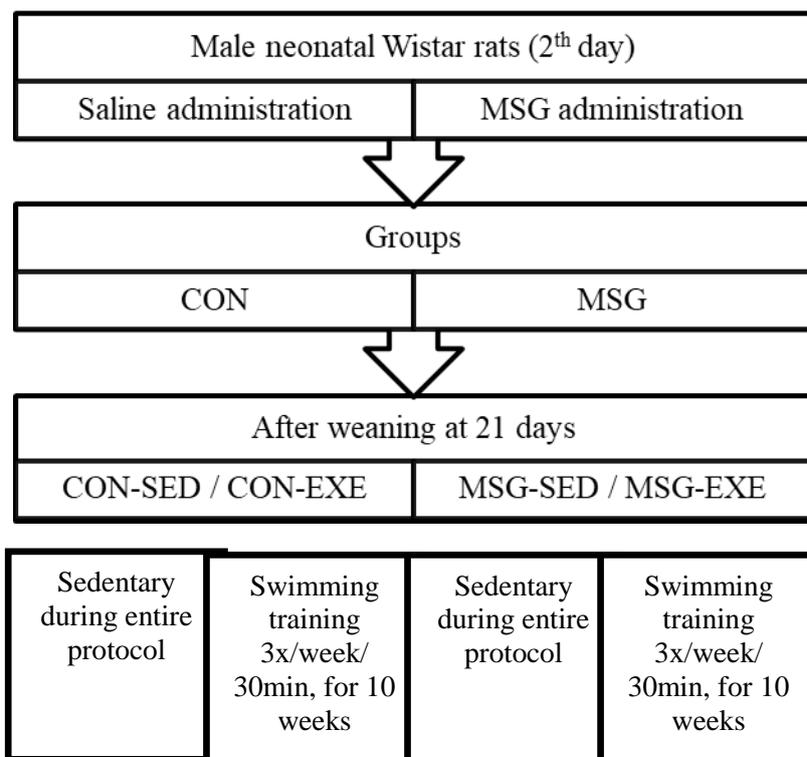
Acetylcholine, Diazoxide, Verapamil and Thapsigargin were purchased from Sigma Chemical (cat.A6625; cat.D9035; cat.V4629; cat.T9033, respectively). <sup>125</sup>I human insulin was purchased from Perkin Elmer (cat: NEX420010UC), and K<sup>+</sup> was purchased from J.T. Baker (cat.3040-01); routine reagents were from Sigma Chemical.

### *2. Animals:*

All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Ponta Grossa (CEUA number 2860). Male neonatal Wistar rats received, during the first 5 days of life, 4mg/g body weight of MSG subcutaneously. An equimolar saline solution was administered to the control group. Both groups were weaned at 21 days of age; animals were maintained at 21±2°C on a 12-h light–dark cycle, with free access to water and standard rodent chow.

### *3. Swimming training:*

After weaning CON and MSG-treated rats were divided into 2 groups: exercised (EXE) and sedentary (SED) rats. The complete swimming training protocol has been described previously<sup>33</sup>. Briefly, after one week to adapt to water and physical activity programs, the training sessions consisted of 30-min swimming, 3 times per week, for 10 weeks. A load equivalent to 5% of body mass was attached to the base of the tail to ensure that rats were in constant swimming activity. The water temperature was maintained at 32±2 °C to avoid stress induced in response to cold. After swimming, the rats were dried and returned to their cages. The diagram below briefly shows the protocol used for obtaining the study groups.



#### 4. *Body Weight and biochemical Plasmatic Parameters:*

After overnight fasting (12h), rats from all groups (90 days of age) were weighed and euthanized by decapitation. Blood samples were collected in heparinized tubes, and centrifuged at 3.000g to obtain plasma that was stored at -20 °C. Glucose and triglyceride plasma levels were measured using the Diasys kit (cat: 1 2531 99 90 314 and cat: 1 5760 99 90 314, respectively) in a Selectra Junior auto analyzer (Vital Scientific, Rheden, Gelderland – Netherlands), and insulin was measured by radioimmunoassay, as previously reported<sup>4746</sup>. In addition, retroperitoneal fat pads were collected and weighed to assess the obesity induced by MSG-treatment.

#### 5. *Islet isolation and insulin secretion*

Islets were isolated from rats of all groups by digestion of the pancreas with collagenase V (1.0mg/mL) and, washed with Hank's solution as previously described<sup>6</sup>. Groups of four isolated islets were pre-incubated for 60 min at 37°C in Krebs solution containing (in

mM): 120 NaCl; 4.8 KCl; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 1.2 MgCl<sub>2</sub>; 24 NaHCO<sub>3</sub> and 5.6 glucose. This medium was gassed with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) to maintain the pH at 7.4 and supplemented with 0.1% of bovine serum albumin (BSA). The Krebs solution was replaced and the islets were incubated for 60 min with several insulin-inducing agents. At the end of the incubation period, the insulin content of the medium was measured by RIA.

#### *5.1 Glucose concentration-response curve:*

A cumulative dose-response curve was performed with glucose (2.8 to 30.0 mM); glucose concentrations used were fitted to a logarithmic function and nonlinear regression analyses were utilized to determine the EC<sub>50</sub>, using GraphPad Prism (GraphPad Prism 6 - San Diego – CA, USA). Data were expressed as the glucose concentration (logarithmic function) as a function of insulin secretion (ng/mL/4 islets/1hour).

#### *5.2 Ach concentration-response:*

Another group of islets was used to perform the cumulative dose-response curve with Ach. For this, islets were incubated with glucose (8.3mM) in the presence of Ach in different concentrations (0.01 to 3.000µM). To avoid Ach degradation, neostigmin (10µM), an inhibitor of acetylcholinesterase enzyme, was added to the incubation mixture. The protocol to calculate the EC<sub>50</sub> from Ach dose-response curve was the same as that described above. The cholinergic insulinotropic effect was expressed as a percentage, considering the glucose-induced insulin secretion by 8.3mM glucose as 100%.

#### *5.3 Determination of glucose-induced insulin secretion by amplifying pathways:*

The metabolic amplifying pathway used for glucose-induced insulin secretion was investigated in another group of islets using the protocol established by Sato et al.<sup>5</sup> Briefly, isolated pancreatic islets were incubated with glucose at 16.7 mM, in the

presence or absence of a high potassium concentration (KCl, 30mM) or Dz (250µM), a  $K^+$ <sub>ATP</sub> channel opener, or glucose 16.7mM plus KCl (30mM) plus Dz (250µM). Data are expressed as percentages, considering glucose-induced insulin secretion by 16.7mM glucose as 100%.

#### *5.4 Calcium influx:*

To investigate the effect of swimming training on  $Ca^{2+}$  mobilization, fresh islets from all groups were incubated with 16.7mM glucose in the presence or absence of Verapamil (VR, 10µM), a blocker of plasma membrane  $Ca^{2+}$  channels, or Thapsigargin (THP, 1µM), an inhibitor of ER  $Ca^{2+}$  ATPase – SERCA, or both pharmacological  $Ca^{2+}$ -blocking drugs. As above, data are expressed as percentages, considering glucose-induced insulin secretion by 16.7mM glucose as 100%.

#### *5.5 Western Blotting*

Islets from 4-6 rats of each group were solubilized in buffer containing 100mM Tris pH 7.5, 10mM/L sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM/L EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2% Triton X-100, final pH 8.08. The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford assay<sup>48</sup>. For sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel electrophoresis and Western blot analysis, samples were treated with a Laemmli buffer. After heating to 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (30µg/lane, 10% gel), and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 5% skimmed milk. Subsequently, the membranes were incubated with three polyclonal antibodies against: Ach-M3R (1:200, cat.M6598, Sigma), PKC-α (1:500, mouse sc-8393, Santa Cruz) and (1:500, rabbit sc-93, Santa Cruz). After washing, the membranes were incubated for 2 hr with a secondary antibody (1:10.000 – Invitrogen) followed by exposure to an

ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Bio-Sciences - Uppsala–Sweden) to detect the chemiluminescence of the nitrocellulose membranes. After assaying the target protein, Western blotting was repeated using  $\alpha$ -tubulin (1:1.000, cat.T6199, Sigma) antibody, as an internal control. Band intensities were quantified by optical densitometry using the Image J software (National Institutes of Health). The data are expressed by normalization with internal control.

#### *5.6 Statistical analysis:*

All data are expressed as means  $\pm$  SEM for the number of determinations (n) indicated. Statistical analyses were carried out using Student's *t* test ( $p < 0.05$ ) and Anova two-way ( $p < 0.05$ ).

#### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge financial support from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant no. 2015/12611-0.

#### **References**

1. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol.* 1989;54(2):87-143.
2. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 2009 May;52(5):739-51.
3. Mislér S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta-cells. *Diabetes.* 1992 Oct;41(10):1221-8.
4. Rorsman P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia.* 1997 May;40(5):487-95.

5. Sato Y, Henquin JC. The K<sup>+</sup>-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes*. 1998 Nov;47(11):1713-21.
6. Gembal M, Detimary P, Gilon P, Gao ZY, Henquin JC. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest*. 1993 Mar;91(3):871-80.
7. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S27-31.
8. Coupland RE. The innervation of pancreas of the rat, cat and rabbit as revealed by the cholinesterase technique. *J Anat*. 1958 Jan;92(1):143-9.
9. Van der Zee EA, Buwalda B, Strubbe JH, Strosberg AD, Luiten PG. Immunocytochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in the rat endocrine pancreas. *Cell Tissue Res*. 1992 Jul;269(1):99-106.
10. Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T, Wess J. A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab*. 2006 Jun;3(6):449-61.
11. Boscher AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol*. 1995 Feb;268(2 Pt 1):E336-42.
12. Guenifi A, Simonsson E, Karlsson S, Ahrén B, Abdel-Halim SM. Carbachol restores insulin release in diabetic GK rat islets by mechanisms largely involving hydrolysis of diacylglycerol and direct interaction with the exocytotic machinery. *Pancreas*. 2001 Mar;22(2):164-71.

13. Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 1998 Jan;23(1):10-4.
14. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology.* 2007 May;132(6):2087-102.
15. Ahrén B, Pacini G. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Jan;7(1):2-8.
16. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):e13-8.
17. Porte D Jr, Kahn SE. beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes.* 2001 Feb;50 Suppl 1:S160-3.
18. Balkau B, Mhamdi L, Oppert JM, Nolan J, Golay A, Porcellati F, Laakso M, Ferrannini E; EGIR-RISC Study Group. Physical activity and insulin sensitivity: the RISC study. *Diabetes.* 2008 Oct;57(10):2613-8.
19. Goodpaster BH, Katsiaras A, Kelley DE. Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes.* 2003 Sep;52(9):2191-7.
20. Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med.* 1998;49:235-61.
21. Zawalich W, Maturo S, Felig P. Influence of physical training on insulin release and glucose utilization by islet cells and liver glucokinase activity in the rat. *Am J Physiol.* 1982 Dec;243(6):E464-9.

22. Farrell PA, Caston AL, Rodd D. Changes in insulin response to glucose after exercise training in partially pancreatectomized rats. *J Appl Physiol* (1985). 1991 Apr;70(4):1563-8.
23. Delghingaro-Augusto V, Décary S, Peyot ML, Latour MG, Lamontagne J, Paradis-Isler N, Lacharité-Lemieux M, Akakpo H, Birot O, Nolan CJ, Prentki M, Bergeron R. Voluntary running exercise prevents  $\beta$ -cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jan 15;302(2):E254-64.
24. Leite Nde C, Ferreira TR, Rickli S, Borck PC, Mathias PC, Emilio HR, Grassioli S. Glycolytic and mitochondrial metabolism in pancreatic islets from MSG-treated obese rats subjected to swimming training. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(2-3):242-56. doi: 10.1159/000343365.
25. Elefteriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology*. 2003 Sep;144(9):3842-7.
26. Maletínská L, Toma RS, Pirnik Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Zelezná B. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Regul Pept*. 2006 Sep 11;136(1-3):58-63.
27. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969 May 9;164(3880):719-21.
28. Morris MJ, Tortelli CF, Filippis A, Proietto J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept*. 1998 Sep 25;75-76:441-7.
29. Zelezná B, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Blokesová D, Maletínská L. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and

- Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. *Physiol Res.* 2009;58(5):717-23.
30. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito Mdo N, Andreazzi AE, Mathias PC, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine.* 2007 Apr;31(2):142-8.
31. Grassioli S, Bonfleur ML, Scomparin DX, Mathias PCF. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K<sup>+</sup>ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. *Endocrine.* 2006 Oct; 30(2): 191-6.
32. Andreazzi AE, Scomparin DX, Mesquita FP, Balbo SL, Gravena C, De Oliveira JC, Rinaldi W, Garcia RM, Grassioli S, Mathias PC. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J Endocrinol.* 2009 Jun;201(3):351-9.
33. Rinaldi W, Gomes RM, Scomparin DX, Grassioli S, Ribeiro TA, Fabricio GS, Barella LF, Pavanello A, Trombini AB, Mathias PC, de Oliveira JC. Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014 Jun 2;11:25.
34. Atef N, Ktorza A, Picon L, Pénicaud L. Increased islet blood flow in obese rats: role of the autonomic nervous system. *Am J Physiol.* 1992 May;262(5 Pt1):E736-40.
35. Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, Barella LF, Franco CC, Trombini AB, Malta A, Gravena C, Torrezan R, Mathias PC, de Oliveira JC. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(4):1075-86.
36. Cantley J, Biden TJ. Targeting triglyceride/fatty acid cycling in  $\beta$ -cells as a therapy for augmenting glucose-stimulated insulin secretion. *Islets.* 2010 Mar-Apr;2(2):127-9.

37. Grespan E, Giorgino T, Arslanian S, Natali A, Ferrannini E, Mari A. Defective Amplifying Pathway of  $\beta$ -Cell Secretory Response to Glucose in Type 2 Diabetes: Integrated Modeling of In Vitro and In Vivo Evidence. *Diabetes*. 2018 Mar;67(3):496-506.
38. Ruiz de Azua I, Gautam D, Jain S, Guettier JM, Wess J. Critical metabolic roles of  $\beta$ -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci*. 2012 Nov 27;91(21-22):986-91.
39. Ribeiro RA, Balbo SL, Roma LP, Camargo RL, Barella LF, Vanzela EC, de Freitas Mathias PC, Carneiro EM, Boschero AC, Bonfleur ML. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. *Mol Biol Rep*. 2013 Jul;40(7):4521-8.
40. Angelini N, Rafacho A, Boschero AC, Bosqueiro JR. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Feb;87(2):184-91.
41. Miranda RA, Torrezan R, de Oliveira JC, Barella LF, da Silva Franco CC, Lisboa PC, Moura EG, Mathias PC. HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. *J Endocrinol*. 2016 Jul;230(1):27-38.
42. Guenifi A, Simonsson E, Karlsson S, Ahrén B, Abdel-Halim SM. Carbachol restores insulin release in diabetic GK rat islets by mechanisms largely involving hydrolysis of diacylglycerol and direct interaction with the exocytotic machinery. *Pancreas*. 2001 Mar;22(2):164-71.
43. Wolters GH, Wiegman JB, Konijnendijk W. Effect of glucose stimulation on <sup>45</sup>calcium uptake and total calcium content of pancreatic islets of fed and fasted rats and obese hyperglycemic mice. *Diabetes*. 1983 Feb;32(2):124-9.
44. Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM, Boschero AC. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of

- uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *J Endocrinol.* 2011 Mar;208(3):257-64.
45. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1981 Nov;21(5):470-5.
46. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

**Table 1. Efeitos da atividade física crônica nos parâmetros biométricos e bioquímicos.**

	CON-SED	CON-EXE	MSG-SED	MSG-EXE	p-value MSG	p-value EXE	p-value interaction
<b>Body Weight (g)</b>	375.50 ± 10.00 <sup>d</sup>	339.30 ± 12.63 <sup>d</sup>	321.20 ± 12.39	289.60 ± 7.65 <sup>a,b</sup>	0.0002	0.0249	0.5327
<b>Retroperitoneal Fat (g/100g)</b>	1.89 ± 0.16 <sup>c,d</sup>	1.61 ± 0.13 <sup>c,d</sup>	3.38 ± 0.08 <sup>a,b</sup>	2.83 ± 0.25 <sup>a,b</sup>	< 0.0001	0.0078	0.3763
<b>Glucose (mg/dL)</b>	112.90 ± 1.90 <sup>b,c,d</sup>	100.10 ± 5.62 <sup>a,c</sup>	127.90 ± 2.42 <sup>a,b,d</sup>	93.29 ± 5.86 <sup>a,c</sup>	0.2693	< 0.0001	0.0045
<b>Insulin (ng/mL)</b>	0.38 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a,b,d</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>c</sup>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	78.22 ± 4.68 <sup>c</sup>	65.86 ± 5.48 <sup>c</sup>	190.40 ± 25.51 <sup>a,b,d</sup>	97.09 ± 2.44 <sup>c</sup>	0.0049	0.0004	< 0.0001

Data are mean±SEM; n=10-16 rats by groups. Letters above numbers show statistical differences in Anova two-way with *Tukey* post-test ( $p < 0.05$ ). a- CON-NS; b – CON-VD; c- MSG-NS and d – MSG-VD.

## Figure legends

**Figure 1. Effect of regular swimming training on glucose dose-response curve in isolated pancreatic islets and glucose sensitivity:** (A) Points on graph represent mean $\pm$ SEM of insulin secretion obtained in each glucose concentration. Groups of 4 islets were incubated in 1 mL of Krebs solution containing increasing concentrations of glucose, as indicated in the methods (n=4-5 animals per group). At least 20 observations were made for each glucose concentration. (B) Glucose sensitivity represents for mean $\pm$ SEM, where Letters above numbers show statistical differences in Anova two-way with Tukey post-test (p<0.05). a- CON-SED; b – CON-EXE; c- MSG-SED and d – MSG-EXE.

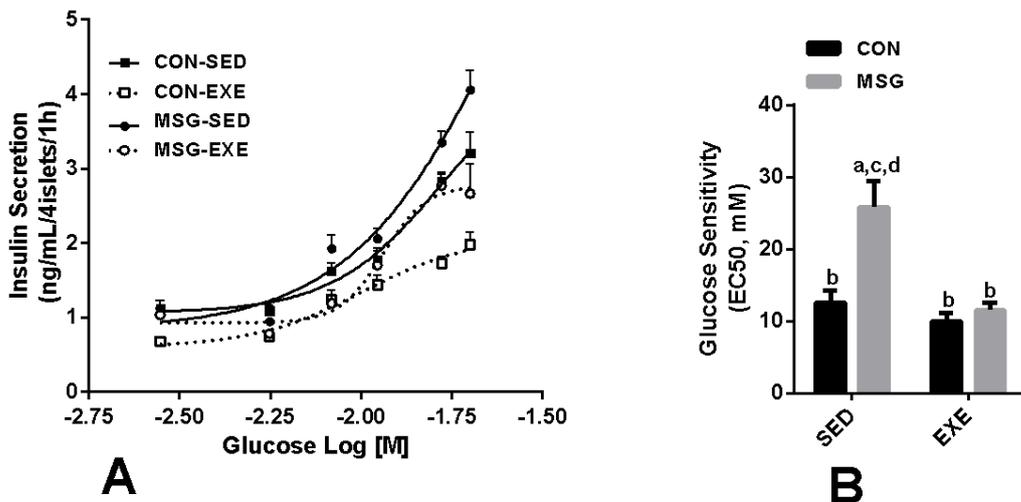
**Figure 2. Cholinergic insulinotropic response and MR3 expression on isolated pancreatic islets from exercised rats:** (A) Points on graph represent mean $\pm$ SEM of insulin secretion in response to glucose (8.3 mM) in the presence of crescent Ach concentration, as indicated in the methods. Data were expressed as percentage considering 8.3mM of glucose as 100%. At least 20 observations were made for each glucose concentration (n= 4-5 animals per group). (B) Protein content is shown for MR3, PKA and PKC. (C) Results are mean $\pm$ SEM values normalized by the housekeeping protein  $\alpha$ -tubulin (n = 3 – 4 rats per group), there was no significant difference between the groups differences in Anova two-way with Tukey post-test (p<0.05).

**Figure 3. Triggering and amplifying pathway of insulin secretion in pancreatic islets isolated from exercised rats:** Groups of 4 islets were incubated in 1 mL of Krebs solution containing 16.7 mM glucose, in the presence or absence of Dz (250 $\mu$ M) and/or

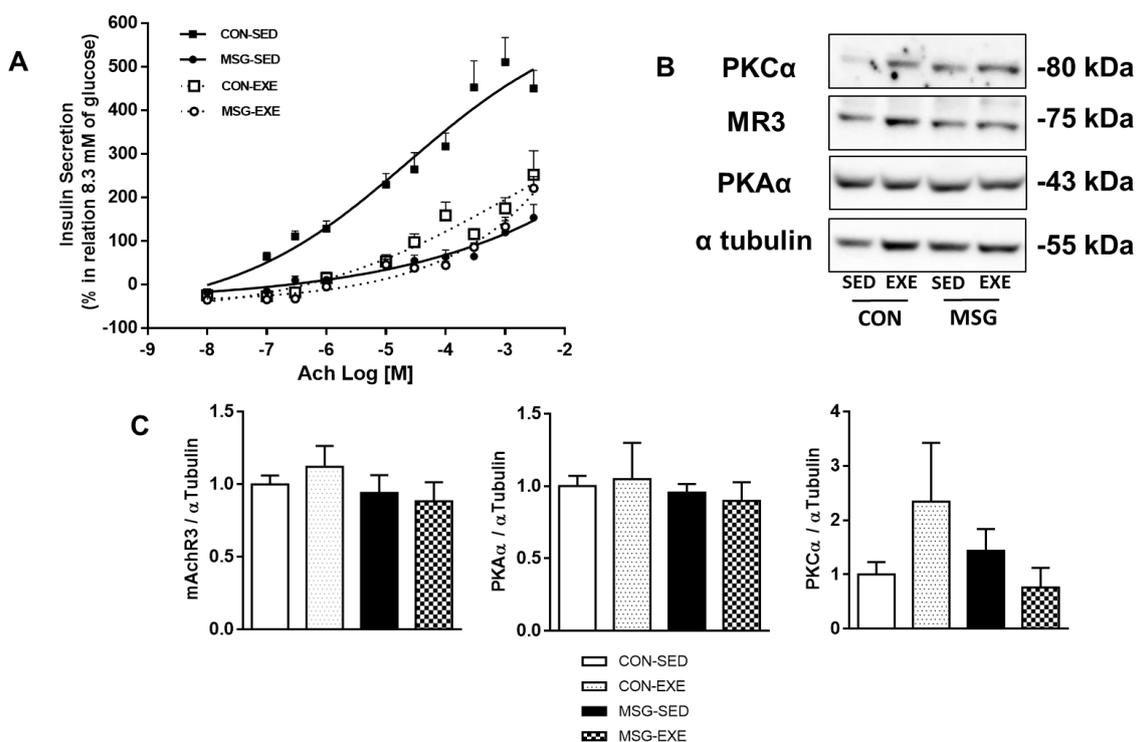
K<sup>+</sup> (30 mM) (n=4-5 animals per group). Data are expressed as percentages, considering 16.7 mM glucose as 100%. At least 20 observations were made for each glucose concentration. CON-SED x MSG-SED (A) and MSG-SED x MSG-EXE (B). Symbols above the bars represent statistical difference \*SED x EXE (p< 0.05), paired *t* test.

**Figure 4. Participation of Ca<sup>2+</sup> in glucose-induced insulin secretion in pancreatic islets isolated from exercised rats:** Groups of 4 islets were incubated in 1 mL Krebs solution containing 16.7 mM glucose, Verapamil (VR, 20μM), an L-type calcium channel blocker or *thapsigargin* (THP, 1μM), a non-competitive inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) (n=4-5 animals per group). Data are expressed as percentages, considering 16.7 mM glucose as 100%. At least 20 observations were made for each glucose concentration. CON-SEDxMSG-SED (A) and MSG-SEDxMSG-EXE (B). (p< 0.05), paired *t* test.

	EC <sub>50</sub>	F (DFn, DFd)	p- value
<b>Interaction</b>		F <sub>(1,76)</sub> = 7.39	= 0.0081
<b>EXE</b>		F <sub>(1,76)</sub> = 15.52	= 0.0002
<b>MSG</b>		F <sub>(1,76)</sub> = 11.62	= 0.0010



**Figura 1.** Efeito da natação regular sobre a curva dose-resposta à glicose em ilhotas pancreáticas isoladas e sua sensibilidade à glicose.



**Figura 2.** Resposta colinérgica e expressão de MR3, PKA e PKC em ilhotas pancreáticas isoladas.

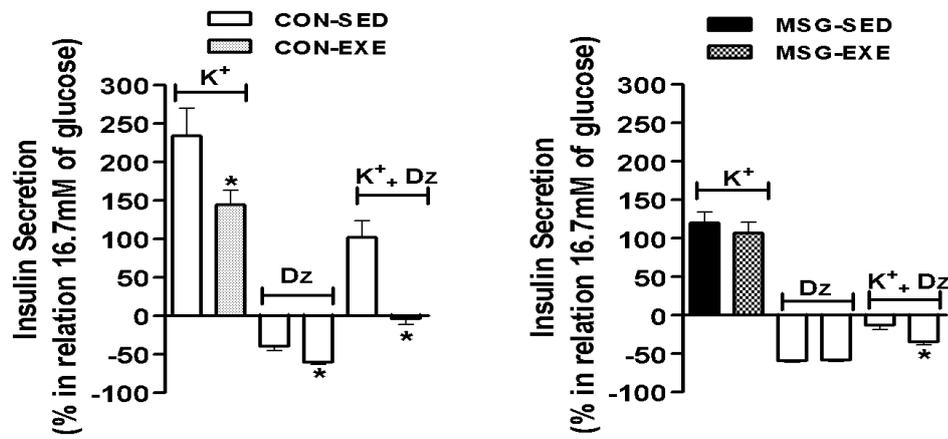


Figura SEQ "Figure" \\* ARABIC 3. Via desencadeadora e amplificada da secreção de insulina nas ilhotas isoladas

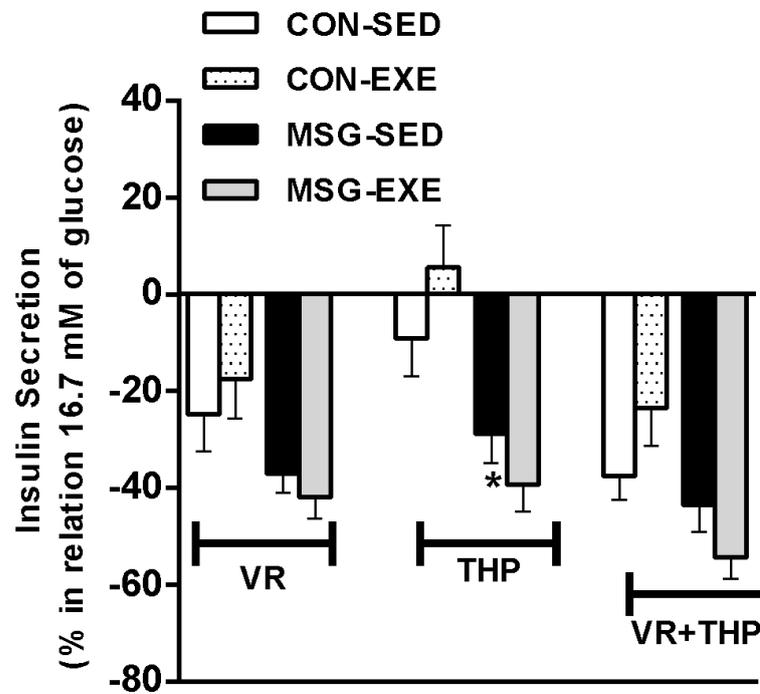


Figura 4. Participação do íon cálcio na secreção de insulina induzida pela glicose.

## APÊNDICE:

### Protocolo para preparação de solução de Hanks

Reagentes	g/L
NaCl	8
KCl	0,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,121
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,185
NaHCO <sub>3</sub>	0,35

O pH deverá ser conferido e acertado para 7,4.

No momento de uso adicionar: 1g de glicose e 1g de albumina, por litro.

## Protocolo para preparação de Solução de Krebs

Preparar as soluções de estoque 1, 2 e 3.

Solução	Sal	g/L
Solução 1	NaCl	26,8
Solução 2	NaHCO <sub>3</sub>	8
	KCl	1,6
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8
	Hepes	14,28
Solução 3	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,6

No momento de uso, adicionar 25% de solução 1, 25% de solução 2, 25% de solução 3 e 25% de água, acertar o pH para 7,4.

## Protocolo para preparação de tampão de ilhotas para Western Blotting

Para 20 mL de tampão:

- 500  $\mu$ L ou 0,074 g de EDTA;
- 8,41 g de ureia;
- 3,05 g de tioureia;
- 84 mg de NaF (100 mM);
- 90 mg de pirofosfato;

Completar com água miliQ.

Aliquotar frações de 1 mL em eppendorf e manter congelado.

Para a preparação da fração de 1 mL, primeiro preparar as seguintes soluções estoque:

1. Ortovanato 10 mM: 37.8 mg de ortovanato para uma solução de 200  $\mu$ L (adicionar cerca de 170  $\mu$ L de água miliQ);
2. PMSF: diluir 9 mg de PMSF em 1000  $\mu$ L de etanol;
3. Triton 10%: diluir 100  $\mu$ L de triton puro em 900  $\mu$ L de água miliQ.

Após a preparação das soluções estoque adicionar as seguintes quantidades na alíquota de 1 mL de tampão previamente preparado:

- 10  $\mu$ L de ortovanato;
- 50  $\mu$ L de PMSF;
- 100  $\mu$ L de triton;
- 1  $\mu$ L de aprotinina pura.

Observações:

1. As soluções estoque de ortovanato, PMSF e triton, deverão ser preparadas no momento de uso e deverão ser descartadas, elas não deverão ser reutilizadas;
2. Todos os eppendorfs e ponteiras utilizadas deverão ser estéreis;
3. A solução de tampão aliquoteada poderá ser armazenada por um grande tempo, desde que esteja devidamente congelada;
4. Depois da solução pronta para uso, esta deverá ser mantida em geladeira, até sua adição às ilhotas.

## **ANEXO A:**

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos [ou no Uso de Animais] da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

## ANEXO B

### **Manuscript Format and Style**

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, as presented in JAMA 1997; 277: 927-34.

**Spelling.** The journal uses UK spelling and authors should follow the latest edition of the *Oxford Concise English Dictionary*.

**Footnotes.** Footnotes arising from the text must not be used.

**Standard abbreviations.** These should be used sparingly. They should be defined in the Summary and on the first mention in the text. In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader.

**Units of measurement.** As far as possible, these should conform to the SI conventions, with the notable exception that blood pressures should be given in mmHg. It is strongly recommended that contributors consult the booklet *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* (Ed. D. N. Baron), 1988, The Royal Society of Medicine Services, London. The recommendations outlined therein will be followed.

### **Methods of statistical analysis**

The journal recommends that investigators seek the advice of a professional biostatistician in the design stage of their study, as well as during the stage of actual data analysis. Statistical methods used should be identified, with appropriate citation of statistical texts or articles that describe their use. Reasons for choosing particular methods of analysis, and for the number of experimental units, should be stated. The name and source of commercial statistical computer packages used should be identified. The statistical section should contain sufficient detail for the reader to have a clear idea about how the analysis was performed. The level of statistical significance ( $\alpha$ ) should be defined and it should be stated explicitly whether this refers to one- or two-sided probability. Nevertheless, exact P values should be given to a sensible number of significant figures (e.g.  $P = 0.01$  rather than  $P = 0.0058$ ). The risk of type 1 error (a false positive inference) should always be controlled. This requires the use of global statistical

tests of significance where possible, particularly in experimental designs that involve repeated measurements in the same experimental units (humans, animals, tissues or cells). Multiple comparisons within a single experiment should only be made when this is absolutely necessary and, if so, P values should be conservatively corrected to control the risk of type 1 error. Two techniques that provide excellent control of the type 1 error rate are the 'false discovery rate' procedure (Curran-Everett D, Benos DJ. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004; 287: R247-9) and the Ryan-Holm stepdown Bonferroni procedure (Ludbrook J. Multiple comparison procedures updated. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25: 1032-7). Confidence intervals may be used in addition to P values.

Data should be expressed as mean (SD) when the intention is to indicate the degree of variability of the data around the mean value, and as mean  $\pm$  SEM when the intention is to estimate the population mean from the sample data. In either case, the numbers of observations (n) should be stipulated. This allows the reader to calculate SD from SEM and vice versa. (For further reading, see Ludbrook J. Comments on journal guidelines for reporting statistics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32: 324-6 (Letter). Detailed guidelines on the use and presentation of statistics in *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* can be found online.

### **Chemical substances**

These must be properly identified. Except for standard laboratory chemicals, the source of supply must be given. Drug nomenclature should follow the rules of the International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, published in various articles in *Pharmacological Reviews*. Proprietary names should be avoided unless the paper is concerned with a specific formulated product, in which case the nature of the formulation should be stated. Isotopically labelled chemicals should be identified by the atomic number and symbol of the isotope, its location in the molecule and the specific activity in standard (SI) units.

### **Receptors**

For receptor types, nomenclature should also follow the conventions established by the IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (International

Union of Basic and Clinical Pharmacology), which are published in *Pharmacological Reviews*.

### **Parts of the Manuscript**

Manuscripts should be presented in the following order: (i) Title Page, (ii) Abstract and keywords, (iii) Introduction, (iv) Results, (v) Discussion, (vi) Methods, (vii) Acknowledgements (including disclosure), (viii) References, (ix) tables (each table complete with title and footnotes), (x) figure legends and (xi) figure. Supporting Information should be supplied as a supplementary file.

The first page of the manuscript should contain the following information:

*Title:* The title should be as informative as possible but should avoid over-detailed information about the experimental procedures. Titles should not exceed 250 characters (including spaces).

*Family name for each author, preceded by initial(s) or given name(s):* That part of each family name which is to appear in indexes must be underlined.

*Laboratory or Institute:* The official name (in English) of each place in which the work reported in the manuscript was carried out should be given, together with the larger organization (if applicable), city, state (if applicable) and country.

*Short title:* This will be used as a running heading in the printed text; it must not exceed a total of 45 characters (including spaces) and should be as informative as possible within this limit. Abbreviations should be avoided if possible.

*Author for correspondence:* The name and full postal address, facsimile, telephone and email details of the corresponding author must be provided and clearly identified. All correspondence regarding the manuscripts, proofs and requests for reprints will be sent to this author, using the contact details provided.

*Present addresses of authors:* Should the addresses of other authors differ from that of the author for correspondence, this information should be provided and will be published.

### **Abstract and keywords**

*Abstract.* This should commence on page two and consist of a continuous paragraph, describing the aim of the study, what was done, the main findings and the conclusions reached. A limit of 250 words applies to article abstracts, and 120 for Letters to the Editor.

*Key words:* These are required for indexing the content of the paper, and should, if possible, be selected from the US National Library of Medicine's Medical Subject

Headings (MeSH) browser list. A maximum of 10 words or phrases should be sufficient. Key words should be arranged in alphabetical order.

References: Up to 60

Figures/tables: Maximum 8

Description: Technical Papers should be based mainly on the presentation of new techniques, or the testing or critique of existing techniques. These should be structured like Original Articles.

### ***Introduction***

This section should commence on a new page and contain a concise statement of the reason for doing the work, and should not contain a major statement about either the findings or the conclusions.

### ***Results***

The findings should be presented clearly with adequate reference to figures and tables. The text of Results and the information contained in figures and tables should complement one another; repetitive presentation of the same data should be avoided. Material appropriate to Discussion should not be included in Results. However, brief comments on minor points are acceptable if they help to consolidate the new information being presented or if they assist the reader to follow the progression of ideas in moving from one set of data to another.

### ***Discussion***

This should not be a mere reiteration of the Results. It should deal with the relationship of the new information given in Results to the corpus of knowledge in that field, and should be pertinent to the data presented. The main conclusions should be incorporated in thin the final paragraph.

### ***Methods***

Sufficient information should be given to permit the work to be repeated in other clinics or laboratories.

### ***Acknowledgements***

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

### ***References***

List all sources in the reference list sequentially as they occur in the text. In text citations should follow the Vancouver style, i.e. numbered and ordered numerically in the reference list. All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list. If cited in tables or figure legends, number according to the first identification of the table or figure in the text. Titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Please note that authors are responsible for the accuracy of the references.

*Journal article:*

2. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Larsen K, Skadhauge LR, Steffensen I, Backer V. The incidence of asthma in young adults. *Chest*. 2005;127:1928-34.

*Book edition:*

2. Storm BC. Asthma. In: Thompson VC, Olson O, editors. *Pulmonary Pathophysiology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 27-42.

**Tables**

should be numbered consecutively in Arabic numerals. Each table should be presented on a separate page with a comprehensive but concise legend above the table. Tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations should be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, § should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P values. The table and its legend/footnotes should be understandable without reference to the text.

**Figures**

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration.

**Size.** Figures will be greatly reduced in size for publication. Fonts must therefore be large and consistent and lines should be relatively thick. Authors should prepare figures to fit within the column (84 mm), or the full text width (176 mm).

**Resolution.** Figures must be supplied as high resolution saved as .eps or .tif.

Halftone figures: 300 dpi (dots per inch)

Colour figures: 300 dpi saved as CMYK

Figures containing text: 400 dpi

Line figures: 1000 dpi Color figures.

Files should be set up as CMYK (cyan, magenta, yellow, black) and not as RGB (red, green, blue) so that colors as they appear on screen will be a closer representation of how they will print in the journal. Figures are published in colour in the journal free of charge.

### ***Figure legends***

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive. The figure and legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Further information can be obtained at: The CEPP Guidelines for Preparation of Figures: and Wiley's guidelines for preparation of figures.

### ***Equations***

Equations should be numbered sequentially with Arabic numerals; these should be ranged right in parentheses. All variables should appear in italics. Use the simplest possible form for all mathematical symbols.

### **Supporting Information**

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. Click here for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

### **Wiley Author Resources**

**Manuscript Preparation Tips:** Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available here. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on Writing for Search Engine Optimization.

**Editing, Translation, and Formatting Support:** Wiley Editing Services can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

## **SUMMARY OF SUBMISSION REQUIREMENTS**

**A cover letter** should be included in the 'Cover Letter Field' of the ScholarOne system. The text can be entered directly into the field or uploaded as a file. The covering letter must contain:

- An acknowledgment that all authors have contributed significantly and that all authors are in agreement with the content of the manuscript.
- In keeping with the latest guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors, each author's contribution to the paper is to be quantified.
- Authors must also state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil in 2013).
- Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest, for more detail refer to the section 'Disclosure' above.

**Two Word-files** need to be included upon submission: A title page file and a main text file that includes all parts of the text in the sequence indicated in the section 'Parts of the manuscript', including tables and figure legends but excluding figures which should be supplied separately.

**The main text file** should be prepared using Microsoft Word, doubled-spaced. All pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the first page of the main text file.

**Each figure** should be supplied as a separate file, with the figure number incorporated in the file name. For submission, low-resolution figures saved as .jpg or .bmp files should be uploaded, for ease of transmission during the review process. Upon acceptance of the article, high-resolution figures (at least 300 d.p.i.) saved as .eps or .tif files will be required.