

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA

IZABELLE DIAS BENFATO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA
ESPONTÂNEA, FLEXIBILIDADE METABÓLICA E
HOMEOSTASE GLICÊMICA DE CAMUNDONGOS
DURANTE O ENVELHECIMENTO**

SANTOS

2014

IZABELLE DIAS BENFATO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA
ESPONTÂNEA, FLEXIBILIDADE METABÓLICA E
HOMEOSTASE GLICÊMICA DE CAMUNDONGOS
DURANTE O ENVELHECIMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos curriculares para obtenção do título de bacharel em Educação Física – Modalidade Saúde.

ORIENTADOR: CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA

COORIENTADOR: CAROLINA PRADO DE FRANÇA CARVALHO

SANTOS

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para toda a minha família, em especial para os meus pais Liliane e José Carlos e ao meu noivo Fernando, por todo o apoio dado em minha trajetória. Dedico este trabalho também, para os meus amigos de laboratório e para todos que contribuíram comigo nesses quatro anos de Graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Camila Aparecida Machado de Oliveira e minha coorientadora Carolina de Prado França Carvalho, por todo o conhecimento transmitido e por toda a paciência que tiveram comigo durante a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro das agências de fomento FAPESP e CNPQ.

Agradeço também as minhas companheiras de laboratório: Thaís Ludmilla Moretto e Francine Pereira de Carvalho por todos os experimentos que realizamos juntas, toda a ajuda durante o processo de término deste trabalho e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

Agradeço também aos meus colegas de classe, pelo companheirismo e coleguismo.

Agradeço a todos os professores com quem tive oportunidade de receber seus valiosos ensinamentos.

Agradeço a toda a minha família e ao meu noivo por todo amor e paciência que tiveram comigo durante a minha jornada.

E por fim, agradeço a Deus, pela força dada nos momentos difíceis.

EPÍGRAFE

“Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias. Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias.”

Lao-Tsé

RESUMO

O Brasil caminha para um perfil demográfico cada vez mais envelhecido. O declínio no nível de atividade física que acompanha o processo de envelhecimento pode contribuir tanto para a alteração da composição corporal (redução da massa livre de gordura e aumento da massa de tecido adiposo) quanto para as doenças metabólicas, como o diabetes *mellitus* tipo 2, cuja prevalência aumenta com a idade. A atividade física espontânea (SPA), definida como movimentos corporais para a realização de atividades rotineiras (excetuando-se esportes e atividades de academia), é um importante componente do gasto energético, podendo representar mais de 50% da energia total diária gasta. Um dos sinalizadores mais importantes do status energético do corpo é o hormônio insulina, que ao agir no hipotálamo, tem como efeito reduzir a ingestão alimentar e parece aumentar a SPA. Dessa maneira, em função do potencial da insulina na regulação da atividade locomotora, o objetivo desse trabalho foi verificar se existe relação temporal entre alteração da sensibilidade à insulina (determinada através do teste de tolerância à insulina e da flexibilidade metabólica) e SPA em camundongos durante o processo de envelhecimento. Camundongos machos C57bl/6 (n=10) com 21 dias de idade foram alimentados com dieta padrão (AING-93G) por 10 meses. A SPA, o gasto energético e a flexibilidade metabólica foram avaliados no 1º, 4º, 8º e 10º mês. Utilizou-se um sistema à base de sensores infravermelhos (Harvard Apparatus) para analisar a SPA e, para o registro do gasto energético e da flexibilidade metabólica, foi utilizado um sistema de calorimetria indireta (Oxylet, Harvard Apparatus). Testes de tolerância à glicose (GTT -2 g de glicose/Kg) e à insulina (ITT -0.5 UI de insulina regular humana/Kg) intraperitoneal foram realizados no 4º e 8º mês. Para a análise estatística foram utilizados o teste *t-student* e ANOVA para medidas repetidas, com nível de significância pré-estabelecido de 5% ($p < 0,05$). Houve um declínio significativo da SPA e do gasto energético a partir do 8º mês, coincidindo com a queda da sensibilidade a insulina avaliada pelo ITT. A flexibilidade metabólica, ao contrário do esperado, foi significativamente maior no 8º mês. O envelhecimento aumentou significativamente a área abaixo da curva (AUC) glicêmica durante o GTT, mostrando que os camundongos desenvolveram intolerância à glicose. Os resultados indicam que a sensibilidade à insulina determinada pelo ITT, mas não pela flexibilidade metabólica, é sensível ao processo de envelhecimento, e que a queda da sensibilidade à insulina parece estar envolvida na redução da SPA em camundongos em processo de envelhecimento.

Palavras-chave: envelhecimento, atividade física espontânea, gasto energético, flexibilidade metabólica, sensibilidade à insulina, obesidade.

ABSTRACT

Brazil moves towards a demographic profile increasingly aged. The decline in physical activity that accompanies aging can contribute to both a change in body composition (decreased fat-free mass and increased adipose tissue mass) and metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus, whose prevalence increases with age. Spontaneous physical activity (SPA), defined as body movements to perform daily activities (except for sports and gym activities), is an important component of the energy expenditure and may represent more than 50% of total daily energy expenditure. One of the most important signals of the energy status of the body is the hormone insulin, which act on the hypothalamus reducing food intake and it seems to increase SPA. Thus, due the potential of insulin to regulate locomotor activity, the aim of this study was to establish the temporal relationship between changes in insulin sensitivity (determined by the insulin tolerance test and metabolic flexibility) and SPA in mice during the aging process. Male mice C57Bl/6 (n = 10) 21 days-old were fed a standard diet (Aing-93G) for 10 months. The SPA, energy expenditure and metabolic flexibility were assessed at 1, 4, 8 and 10 months. We used a system based on infrared sensors (Harvard Apparatus) to analyze SPA and an indirect calorimetry system (Oxylet, Harvard Apparatus) to record energy expenditure and metabolic flexibility. Intraperitoneal glucose (GTT -2 g glucose / kg) and insulin (ITT -0.5 IU human regular insulin/kg) tolerance tests were performed at 4 and 8 months. For statistical analysis, the Student t test and ANOVA for repeated measures, with pre-established level of significance of 5% ($p < 0.05$) were used. There was a significant decline in SPA and energy expenditure from the 8th month on, coinciding with the decline in insulin sensitivity assessed by ITT. The metabolic flexibility, contrary to expectations, was significantly higher in the 8th month. Aging significantly increased the area under the curve (AUC) for glucose during GTT, showing that mice developed glucose intolerance. The results indicate that insulin sensitivity determined by ITT, but not by metabolic flexibility, is sensitive to the aging process, and that the decrease in insulin sensitivity appears to be involved in the reduction of SPA in aging mice.

Keywords: aging, spontaneous physical activity, energy expenditure, metabolic flexibility, sensitivity to insulin, obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC – *area under curve*

AFE – atividade física espontânea

AgRP - proteína relacionada ao gene agouti

ARC – núcleo arqueado do hipotálamo

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CART - transcritos regulados por cocaína e anfetamina

GTT – teste de tolerância à glicose

kITT – taxa de remoção de glicose

IMC – índice de massa corporal

ITT – teste de tolerância à insulina

MCH - *melanin-concentrating hormone*

NEAT - *nonexercise activity thermogenesis*

NPY – neuropeptídeo Y

POMC – proopiomelanocortina

PVN – núcleo paraventricular

QR – quociente respiratório

SPA - *spontaneous physical activity*

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1. Envelhecimento	10
1.2. Atividade física	11
1.3. Controle do balanço energético	13
2. Objetivos	18
3. Métodos	19
3.1. Animais	19
3.2 Atividade física espontânea e Calorimetria indireta	19
3.3. Flexibilidade metabólica	20
3.4. Glicemia	20
3.5 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina	20
3.6 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose	20
3.7 Eutanásia	21
3.8 Estatística	21
4. Resultados	22
5. Discussão	30
6. Conclusão	34
7. Referências Bibliográficas	35
8. Anexos	40

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem como tema a Educação Física e o envelhecimento. Nosso problema de pesquisa é entender de que forma o envelhecimento influencia na atividade física espontânea, flexibilidade metabólica e homeostase glicêmica em camundongos.

Por tratar-se de uma pesquisa experimental, o meu interesse nesse tipo de pesquisa foi despertado durante matérias que abordavam conhecimentos biológicos na graduação, como fisiologia, anatomia e patologia.

No mundo, a porcentagem da população com 60 anos ou mais aumentou rapidamente. O Brasil caminha na mesma direção, para um perfil demográfico cada vez mais envelhecido. De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2008), para cada grupo de 100 crianças de 0 a 14 anos em 2008 existiam 24,7 idosos de 65 anos ou mais. Em 2050, para cada 100 crianças de 0 a 14 anos existirão cerca de 170 idosos.

Com o aumento da idade ocorre uma mudança da composição corporal, com redução da massa magra e aumento do tecido adiposo (HUGHES *et al.*, 2002). Esse aumento da adiposidade, em especial na região intra-abdominal, é um fator importante para a queda da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina que acompanha o envelhecimento. Composto o conjunto das alterações que se manifestam com a idade, ocorre também um declínio no nível de atividade física (WESTERTEP, 2000; WESTERTEP, 2001; HUGHES *et al.*, 2002), o que pode favorecer as alterações da composição corporal mencionadas. Nesse contexto, estudos que possam contribuir para um melhor entendimento dos determinantes da queda atividade física que ocorre com o envelhecimento são de grande importância, e podem revelar novas estratégias para reduzir esse comportamento. Conhecer essas alterações é de suma importância para o profissional de Educação Física, pois, a prescrição de exercícios físicos para uma pessoa jovem e para uma pessoa idosa é diferente em diversos aspectos. Ao compreender as mudanças comportamentais e metabólicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento, o profissional de Educação Física pode prescrever um plano de exercícios o mais individualizando possível, que contemple todas as necessidades metabólicas e fisiológicas da pessoa idosa.

A insulina tem um papel muito importante na regulação da homeostase energética. Esse hormônio reduz a ingestão alimentar ao agir em neurônios hipotalâmicos específicos, como os que produzem os neurotransmissores NPY e AgRP (orexígenos) e POMC e CART (anorexígenos) (BOWE *et al.*, 2014). Entretanto, além de reduzir a ingestão alimentar, ela parece ser capaz de também afetar o balanço energético ao aumentar a atividade locomotora e, conseqüentemente, o gasto de energia (HENNIGE *et al.*, 2009). Dessa forma, acreditamos que a redução na atividade

física que ocorre com o envelhecimento possa ter uma relação com a redução da sensibilidade a esse hormônio.

1.1 Envelhecimento

Podemos dividir o idoso em: jovem (de 65 á 75 anos), médio (de 75 a 85 anos) e muito velho (mais de 85 anos) (VAISBERG, 2008). Porém, alguns autores consideram idosos pessoas com 60 anos ou mais (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Mundialmente, a porcentagem da população com idade igual ou acima de 60 anos aumentou de 8% para 10% na segunda metade do século 20, e de 10 para 21% na primeira metade desse século (NAÇÕES UNIDAS, 2001).

O envelhecimento da população global é um resultado da queda tanto dos valores de mortalidade quanto de fertilidade. Atualmente, a taxa total de fertilidade está abaixo do nível de reposição em praticamente todos os países industrializados. Nas regiões menos desenvolvidas, embora o declínio da fertilidade tenha se iniciado mais tardiamente, ele tem avançado mais rápido que em regiões mais desenvolvidas (NAÇÕES UNIDAS, 2001).

No Brasil, o quadro não é diferente. A população brasileira envelhece em ritmo acelerado. A taxa de crescimento populacional tem declinado desde 1960, juntamente com quedas pronunciadas da fecundidade. Segundo as projeções, o país apresentará um potencial de crescimento populacional até 2039, quando se espera que a população atinja o chamado “crescimento zero”. A partir desse ano serão registradas taxas de crescimento negativas, que correspondem à queda no número da população (IBGE, 2008).

Com o avanço da medicina e as melhorias nas condições de vida da população, a média de vida do brasileiro também tem aumentado, em consonância com o que acontece em nível mundial. A expectativa de vida ao nascer, que em 1940 era de 45,5 anos, saltou para 72,7 anos em 2008 e deverá chegar a 81,3 anos no Brasil em 2050 (IBGE, 2008). O envelhecimento populacional traz implicações econômicas importantes. O número de pessoas que ingressam (e permanecem) nas idades ativas (15 a 64 anos), e aquelas que atingem as chamadas idades potencialmente inativas (65 anos ou mais de idade), que era de 12/1 em 2000, deve chegar a 3/1 em 2050 (IBGE, 2008).

Outra questão, com repercussão além da econômica, é o fato de o envelhecimento ser um importante fator de risco para várias doenças. Embora cada indivíduo reaja de forma única ao avanço da idade (FARINATTI, 2002), esta fase de vida não é alcançada de uma forma satisfatória sem que se façam presentes os surgimentos de problemas, quer sejam de ordem orgânica ou psicológica (NETTO, 2004). Doenças cuja prevalência aumentam com a idade incluem, além do diabetes mellitus tipo 2, as doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e também o surgimento de sintomas depressivos (RAMOS, 2003; WILD *et al.*, 2004; NICOLLI e PARTRIDGE, 2012). Dessa forma, à medida que o número de idosos aumenta e a população

envelhece, ocorre paralelamente o aumento da prevalência dessas doenças. Já é conhecido de longa data que a tolerância à glicose deteriora-se com o envelhecimento (DAVIDSON, 1979), principalmente como consequência de uma menor sensibilidade à insulina (DEFRONZO, 1979 ; FINK *et al.*, 1983). Com o avanço da idade, ocorre também um aumento da massa de tecido adiposo (HUGHES *et al.*, 2002). O depósito de tecido adiposo intra-abdominal correlaciona-se positivamente com idade e resistência à insulina em indivíduos saudáveis não diabéticos (CEFALU *et al.*, 1995).

A diminuição do nível de atividade física, característica do envelhecimento, pode levar o idoso a um estado de dependência e fragilidade. As alterações no aparelho locomotor que ocorrem nesse estágio da vida (perda no equilíbrio, fragilidade óssea, dores articulares, etc) podem ter seu efeito minimizado por meio da prática regular de exercícios físicos (PEDRINELLI, 2009, p.100), contribuindo para o que se chama envelhecimento bem sucedido, no qual o indivíduo preserva a capacidade de realizar suas funções, como suas tarefas de vida diária (exemplo: cozinhar, lavar a roupa e cuidados com a higiene pessoal) (VAISBERG, 2008).

Estima-se que a inatividade física cause 6% dos casos de doença arterial coronariana, 7% dos casos de diabetes *mellitus* tipo 2, e 10% dos cânceres de mama e de cólon, doenças cuja prevalência também aumenta com o envelhecimento. Com relação à mortalidade prematura, 9% seria causada pela falta de exercício. A redução do sedentarismo em 10% a 25% poderia evitar 533.000 a 1.3 milhões de morte por ano, respectivamente (LEE *et al.*, 2012). Dessa maneira, fica claro o papel da atividade física, tanto no sentido de diminuir os problemas locomotores causados pelo envelhecimento quanto às doenças associadas a esse processo.

1.2 Atividade física

A atividade física¹ está intrinsecamente relacionada à existência de nossa espécie, uma vez que era necessária e obrigatória para a obtenção de alimento e água, para conseguir abrigo, para confecção de materiais para a guerra, entre outros. Por outro lado, a falta de atividade física na sociedade moderna encontra-se relacionada ao aumento de grande número de doenças crônico-degenerativas (BOOTH *et al.*, 2000; BOOTH *et al.*, 2002; CHAKRAVARTHY e BOOTH, 2004; LEE *et al.*, 2012). Estima-se que a inatividade física seja responsável por 6% dos casos de doença

¹ Para fins deste estudo, a atividade física será conceituada como: qualquer movimento corporal, produzido pelo músculo esquelético, que resulte em gasto energético. (CASPERSEN, 1985).

arterial coronariana, 7% dos casos de diabetes mellitus tipo 2, e 10% dos cânceres de mama e de cólon (LEE *et al.*, 2012).

No mundo, cerca de 30% dos adultos são fisicamente inativos, e esse valor chega a 43% nas Américas (HALLAL *et al.*, 2012). Com relação à mortalidade prematura, 9% seriam causadas pela falta de exercício. A redução do sedentarismo em 10% a 25% poderia evitar 533.000 a 1.3 milhões de morte por ano, respectivamente (LEE *et al.*, 2012). Em trabalho recente, Moore *et al.* (2012) quantificaram o aumento da expectativa de vida em função do exercício, e observaram que um nível de atividade física de intensidade equivalente a uma caminhada rápida 75 min/semana foi associada a um ganho de 1.8 anos. Níveis mais elevados foram associados a maiores ganhos, chegando a 4.5 anos. Quando comparados a indivíduos sedentários e obesos (IMC $35.0 \geq$), ser ativo (≥ 7.5 equivalentes metabólicos-h/semana) e eutrófico (IMC 18.5–24.9) estava associado a um ganho de 7.2 anos de vida. Em conjunto, esses trabalhos evidenciam a grande importância da realização da atividade física de forma regular.

A atividade física pode ser classificada em atividade física espontânea (*spontaneous physical activity*, SPA) e exercício voluntário (esportes, academia, p. ex.). Em roedores, a SPA equivale a movimentação do animal na gaiola ao passo que considera-se a natação, esteira, escada para força ou o livre acesso a roda de atividades como o equivalente do exercício voluntário em humanos (KOTZ, 2006a; NOVAK e LEVINE, 2007). Tanto a SPA como o exercício voluntário são responsáveis pela termogênese de atividade. A *nonexercise activity thermogenesis* (NEAT) é a termogênese provocada apenas pela SPA. Mesmo em pessoas que se exercitam regularmente, a NEAT é o componente predominante da termogênese de atividade. Ela é a energia gasta para tudo que não seja dormir, comer ou atividades esportivas, e compreende a energia gasta no trabalho, lazer, andar, etc. A NEAT varia entre 15% da energia total diária gasta em pessoas muito sedentárias até 50% ou mais em indivíduos muito ativos. Em camundongos abrigados em gaiolas convencionais, sem acesso a roda de atividade, a NEAT corresponde a aproximadamente 40% da energia total diária gasta (LEVINE, 2004; NOVAK e LEVINE, 2007).

Estudos realizados em humanos mostram que apresentamos grande variação interindividual na suscetibilidade ao ganho de peso em resposta ao excesso de alimentação. A adição de 1000 kcal/dia na dieta de 16 voluntários, por 8 semanas, resultou numa variação de 10 vezes no acúmulo de gordura (ganho de peso variando entre 0,36 a 4,23 Kg). Os pesquisadores responsabilizaram as alterações na NEAT por essa variação ao analisar os componentes do gasto energético diário total (taxa metabólica basal, termogênese pós-prandial e termogênese da atividade física), e sugeriram que a falha em ativar a NEAT pode resultar em rápido ganho de peso (LEVINE *et al.*, 1999).

Outro dado importante ao pensar em homeostase energética e atividade física espontânea diz respeito às mudanças compensatórias na NEAT em resposta ao exercício voluntário, e os idosos parecem ser especialmente suscetíveis a essa compensação. Poehlm (1992) observou uma redução de 62% na NEAT após a introdução de um protocolo de exercício voluntário na rotina de idosos (três vezes por semana com intensidade moderada, durante 8 semanas, com um custo de energia de 300 kcal/seção), de modo que não houve alteração no gasto energético diário total. Meijner *et al.* (1999) observaram que mesmo com um programa de treinamento moderado, duas vezes por semana, a atividade física diária total em idosos não mudou devido a uma diminuição compensatória na SPA. Em outro estudo, apesar do custo de energia adicional do exercício voluntário, o gasto energético diário total também não foi alterado em indivíduos idosos após 14 semanas de treinamento aeróbico três vezes por semana. Isto foi causado por uma redução compensatória na SPA (MORIO *et al.*, 1998). Ao analisar o tempo gasto pelos sujeitos em várias categorias de atividades físicas, os autores encontraram uma redução significativa no tempo gasto andando (MORIO *et al.*, 1998).

Embora a NEAT seja uma variável crítica ao considerar o balanço energético, e a atividade física tenha um potencial equivalente à ingestão alimentar para provocar mudanças na massa corporal, pouco se sabe a cerca dos mecanismos neurais, endócrinos e moleculares que a influenciam. Levando-se em consideração o impacto do sedentarismo na morbi-mortalidade, o envelhecimento da população e o declínio no nível de atividade física que ocorre nessa fase e as alterações funcionais que acompanham esse processo, em especial as doenças metabólicas, estudos no sentido de esclarecer os mecanismos que controlam a SPA poderiam oferecer novos alvos terapêuticos com o intuito de prevenir, retardar e/ou tratar algumas das patologias relacionadas com o aumento da idade.

1.3 Controle do balanço energético

A massa corporal permanece estável quando a ingestão e o gasto energético estão em equilíbrio. O gasto energético pode ser dividido em três categorias principais: funções fisiológicas e celulares básicas que requerem ATP (termogênese de repouso), o efeito térmico do alimento e a termogênese induzida pela atividade física (LEVINE, 2004).

O hipotálamo, mais especificamente o núcleo arqueado (ARC), desempenha um papel fundamental no balanço energético, conectando sinais aferentes com circuitos centrais e enviando comandos eferentes para controlar a ingestão alimentar, atividade motora e metabolismo celular periférico (WYNNE *et al.*, 2005; NOVAK e LEVINE, 2007). Embora a atividade física consuma calorias, ela é essencial para a obtenção de alimentos. Dessa forma, devem existir mecanismos

moleculares que integrem esses comportamentos complexos - ingestão alimentar e atividade física - na busca pela homeostase energética (NOVAK e LEVINE, 2007).

Conforme apresentado na Figura 1, neurônios no ARC expressam neuropeptídeos específicos com efeitos orexigênicos e anorexigênicos (WYNNE *et al.*, 2005). Uma população neuronal importante contém neurônios coexpressando neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao gene agouti (AgRP), potentes estimuladores da ingestão alimentar, que promovem ganho de peso e aumentam a secreção de outros neuropeptídeos orexigênicos incluindo *melanin-concentrating hormone* (MCH) e hipocretina/orexina à partir do hipotálamo lateral (LENARD e BERTHOUD, 2008).

Outra população de neurônios no ARC coexpressa proopiomelanocortina (POMC) e transcritos regulados por cocaína e anfetamina (CART), que inibem a ingestão de alimentos e causam redução da massa corporal. Ambas as populações neuronais enviam projeções densas para outros neurônios envolvidos no metabolismo energético localizados no núcleo paraventricular (PVN), zona incerta, área perifornical e hipotálamo lateral (VELLOSO, 2009). Os neurônios NPY/AgRP também inibem diretamente os neurônios POMC e antagonizam a ação do α -MSH sobre os receptores de melanocortina do tipo 4 (MC4R) via liberação de AgRP (VELLOSO, 2009).

Se os neuropeptídios do ARC alteram a NEAT para alcançar o balanço energético, seria de se esperar que sinais que estimulem a fome (NPY e AgRP) diminuam, ao passo que sinais de saciedade (CART e POMC) aumentem a NEAT. Assim sendo, sinais periféricos e centrais que modulam a fome têm o potencial de afetar a NEAT (NOVAK e LEVINE, 2007).

Entre os sinais periféricos que regulam a ingestão alimentar temos nutrientes, como glicose e ácidos graxos livres, e vários hormônios, com destaque para a insulina e leptina, que sinalizam adiposidade. A concentração desses dois hormônios se correlaciona positivamente com a massa de tecido adiposo (NISWENDER e SCHWARTZ, 2003; WYNNE *et al.*, 2005; NOVAK e LEVINE, 2007). Tanto a insulina quanto a leptina promovem redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético e agem ativando neurônios POMC e inibindo os neurônios orexigênicos NPY/AgRP no ARC (NISWENDER e SCHWARTZ, 2003; WYNNE *et al.*, 2005).

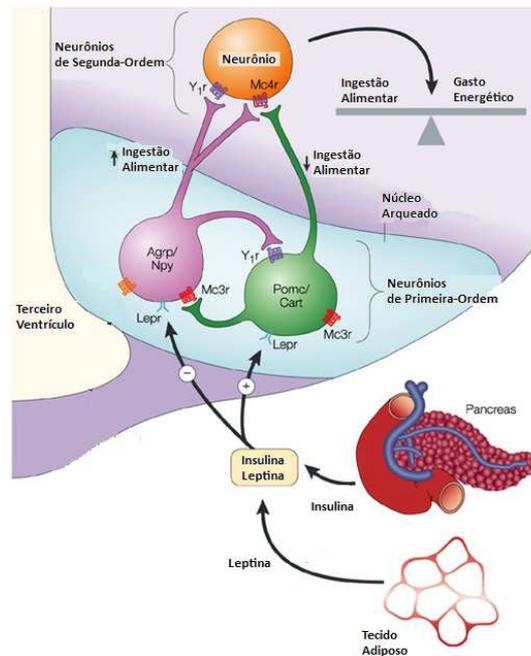


Figura 1. Essa figura mostra os dois conjuntos de neurônios no núcleo arqueado hipotalâmico - AgRP/NPY e POMC/CART - que são regulados por hormônios circulantes. AgRP (proteína agouti-relacionado) e NPY (neuropeptídeo Y) são neuropeptídeos que estimulam a ingestão de alimentos e diminuem o gasto de energia, enquanto que o α -MSH (um derivado pós-translacional da proopiomelanocortina, POMC) e CART (transcritos regulados por cocaína e anfetamina) são neuropeptídeos que inibem a ingestão de alimentos e aumentam o gasto energético. A insulina e leptina são hormônios que circulam em proporção aos estoques de tecido adiposo do corpo. Ambos inibem os neurônios AgRP/NPY e estimulam os neurônios adjacentes POMC/CART. Lepr, receptor de leptina; MC3R/Mc4r, receptor para melanocortina 3 e 4; Y1R, receptor do neuropeptídeo Y1 (Adaptado de Barsh e Schwartz 2002).

Embora existam evidências em roedores (CARVALHEIRA *et al.*, 2003) e humanos (HALLSCHMID e SCHULTES, 2009) de que alterações na ação da insulina no cérebro são acompanhadas por um fenótipo obeso, o impacto da insulina em aspectos comportamentais como a locomoção não está bem esclarecido. Apesar de Menéndez e Atrens (1993) não terem observado efeitos da insulina administrada no núcleo hipotalâmico paraventricular de ratos sobre a locomoção, estudos mais recentes tem observado o contrário.

Hennige *et al.* (2009) mostraram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de insulina promoveu um aumento na SPA de camundongos. Contudo, esse hormônio não teve efeito em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas. Esses animais eram hipocinéticos e apresentavam quadro de resistência central a ação da insulina. A inibição farmacológica da via de sinalização da insulina (bloqueio da PI3K com *wortmanin*, administrada via intraperitoneal), também diminui a atividade locomotora de camundongos (BANDARU *et al.*, 2010).

Conforme mencionado anteriormente, a idade correlaciona-se inversamente com o nível de atividade física (WESTERTERP, 2000; WESTERTERP, 2001). Com o envelhecimento ocorre ainda uma redução da sensibilidade à insulina (DEFRONZO, 1979; FINK *et al.*, 1983). Em função disso e do possível papel da insulina como reguladora da atividade locomotora, levantamos a

hipótese de que a queda no nível de atividade física que ocorre no envelhecimento poderia ser uma decorrência da redução da sensibilidade a esse hormônio, de modo que ambos os fenômenos fossem temporalmente relacionados. Dessa maneira, optamos por avaliar a sensibilidade à insulina por meio do teste de tolerância à insulina e da flexibilidade metabólica em paralelo a avaliação da atividade física espontânea de camundongos ao longo do tempo.

O teste de tolerância à insulina é amplamente utilizado e consiste na monitorização dos níveis de glicose no sangue ao longo do tempo em resposta a administração intraperitoneal ou intravenosa de insulina. A taxa de queda da glicemia em resposta à administração de insulina é um indicativo da sensibilidade ao hormônio, primariamente no fígado e no músculo esquelético (BOWE *et al.*, 2014).

A flexibilidade metabólica consiste na habilidade de um organismo em ajustar a oxidação de substrato à sua disponibilidade. Uma forma usual de estimar a flexibilidade metabólica em resposta a refeições é pela diferença entre o quociente respiratório (QR) basal (jejum) e estimulado (estado alimentado), conhecido como ΔQR (GALGANI *et al.*, 2008). Quanto mais próximo de 1 o nosso quociente respiratório, mais carboidratos estamos oxidando. Valores em torno 0,70 indicam maior oxidação de lipídeos (BROOKS *et al.*, 2013). Nesse exemplo, conforme demonstrado pela linha preta na figura 2, teríamos um valor de ΔQR em torno de 0,30. No intervalo entre as refeições ou em jejum, utilizamos preferencialmente lipídeos como substrato energético. Após uma refeição, ocorre aumento da secreção de insulina e uso preferencial de carboidratos.

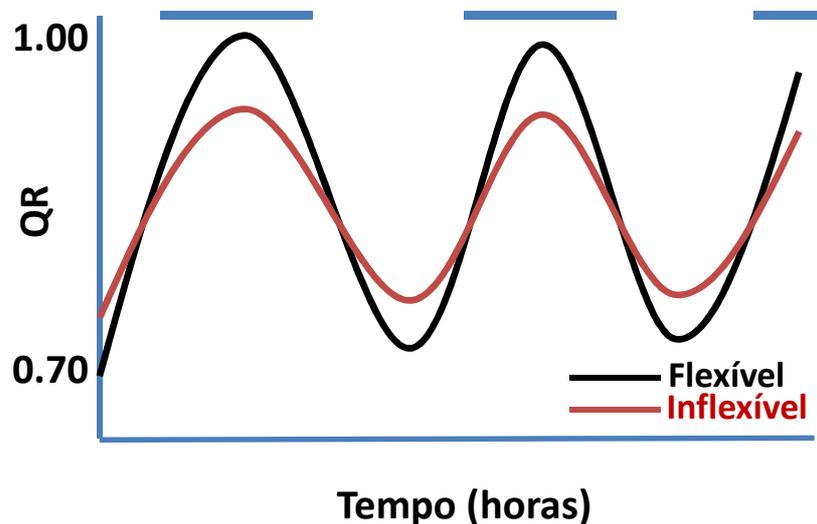


Figura 2. Exemplos de oscilação do quociente respiratório em roedores ao longo de dias. Os traços superiores indicam o período em que as luzes são apagadas (ciclo escuro, das 19:00 as 7:00 horas). Como roedores são animais noturnos, é nesse período que eles preferencialmente se alimentam. Linha preta: camundongo flexível metabolicamente; linha vermelha: camundongo inflexível.

A inabilidade em modificar a oxidação do substrato em resposta à mudanças na disponibilidade de nutrientes tem sido implicada no acúmulo intramiocelular de lipídeos e resistência à insulina e também é conhecida como inflexibilidade metabólica (KELLEY, 2005). Um

indivíduo inflexível metabolicamente apresenta durante o jejum baixa preferência pela oxidação lipídica no músculo e menor supressão na oxidação da glicose, enquanto que no estado alimentado apresenta baixa oxidação lipídica e menor estímulo a oxidação da glicose. (KELLEY, 2005). Nesse caso, o ΔQR seria menor (Figura 2, linha vermelha). Dessa forma, a avaliação crônica da flexibilidade metabólica pode trazer informações sobre o *status* da sensibilidade à insulina durante o processo de envelhecimento.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Verificar se existe correlação entre sensibilidade a insulina, avaliada pelo teste de tolerância a insulina e pela flexibilidade metabólica, e atividade física espontânea em camundongos durante o processo de envelhecimento (do desmame ao décimo mês de vida).

Objetivos específicos

- Analisar a massa corporal e a ingestão alimentar mensal dos camundongos ao longo do experimento;
- Analisar a atividade física espontânea e gasto energético dos camundongos ao longo do período experimental (no 1o, 4o, 8o e 10o mês de idade);
- Analisar a flexibilidade metabólica dos camundongos ao longo do período experimental (no 1o, 4o, 8o e 10o mês de idade);
- Analisar a sensibilidade à insulina pelo teste de tolerância à insulina em camundongos no 4o e 8o mês de vida;
- Analisar a homeostase glicêmica por meio da glicemia de jejum e teste de tolerância à glicose em camundongos no 4o e 8o mês de vida.

3. MÉTODOS

Para atender as demandas deste trabalho, foi realizada uma pesquisa experimental, utilizando camundongos e com uma abordagem quantitativa na interpretação de dados e resultados. O diferencial desse tipo de abordagem é a intenção de garantir a precisão dos trabalhos realizados, conduzindo a um resultando com poucas chances de distorções (DALFOVO, 2008).

3.1 Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA-Unifesp, protocolo nº 8191200114. Foram utilizados camundongos C57bl/6 machos provenientes do Biotério Central da Unifesp. Os camundongos foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Biociências da Unifesp - Baixada Santista (Registro CEUA/ UNIFESP n.28), com ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes apagadas das 19:00 às 7:00) e temperatura de 22 ± 2 °C, e com livre acesso a água e ração (AING-93G, fabricada por Rhoster Indústria e Comércio Ltda, Araçoiaba da Serra-SP). Os experimentos foram iniciados com camundongos aos 21 dias de vida e as avaliações descritas abaixo foram realizadas pelo período de 10 meses. Foram utilizados 10 camundongos, que foram divididos em Gaiola A e Gaiola B (cinco animais em cada gaiola). Os animais foram identificados como 1a,2a,3a,4a,5a (para a Gaiola A) e 1b,2b,3b,4b,5b (para a Gaiola B). Os animais tiveram a massa corporal e ingestão alimentar individual registrados semanalmente. A ingestão alimentar foi realizada de acordo com a massa corporal do animal (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

3.2 Atividade física espontânea (SPA) e Calorimetria indireta

A SPA foi medida no 1o, 4o, 8o e 10o mês. Para isso utilizamos um sistema à base de sensores infravermelhos (Harvard Apparatus). A SPA foi avaliada, individualmente, nos eixos x e y em gaiolas com as dimensões de 28 x 28 cm. O sistema fornece contagem total (cada vez que um raio infravermelho é interrompido) e contagem ambulatória (cada vez que um novo raio infravermelho é interrompido). O registro de contagem ambulatória não inclui o mesmo raio sendo interrompido repetidamente e, portanto, mede a locomoção real, não incluindo comportamentos como coçar-se e limpar-se. A SPA foi registrada por 48-72 horas consecutivas, e nesse período os camundongos tinham livre acesso a ração e água. A calorimetria indireta (consumo de O₂ e produção de CO₂) foi analisada à temperatura ambiente (22 ° C). Em suma, os camundongos foram colocados individualmente em câmaras especificamente projetadas por 48-72 h com livre acesso a alimentação e água (sistema Oxylet, Panlab-Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha). O consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, bem como o gasto de energia foram calculados

utilizando o software Metabolismo (Panlab-Harvard Apparatus; Barcelona; Espanha) (KOTZ *et al.*, 2006a); (YAMADA *et al.*, 1989)

3.3 Flexibilidade metabólica

A diferença entre o quociente respiratório (QR) basal (jejum) e estimulado (estado alimentado), conhecido como ΔQR , é uma forma usual de estimar a flexibilidade metabólica em resposta a refeições (GALGANI 2008). Para avaliar o ΔQR ($QR_{\text{estimulado}} - QR_{\text{basal}}$), foi subtraído o menor valor de QR do valor mais elevado ao longo de um ciclo claro-escuro completo (24 horas). O menor valor de QR ocorre na fase clara do ciclo (luzes acesas das 7:00 as 19:00), período em que normalmente os roedores dormem, enquanto que o maior valor é observado na fase escura do ciclo, por ser o período em que roedores são ativos e se alimentam. Os valores de quociente respiratório foram obtidos à partir do sistema de Calorimetria indireta (sistema Oxylet, Harvard apparatus). A flexibilidade metabólica foi determinada no 1o, 4o, 8o e 10o mês (GALGANI, 2008).

3.4 Glicemia de jejum

Os camundongos permaneceram em jejum por um período de 8 horas (ração retirada as 7:00). A glicemia plasmática de jejum foi determinada utilizando-se glicosímetro Accu Check Advantage II (Roche). Amostra de sangue foi coletada por meio de corte na extremidade distal na cauda dos camundongos, sem imobilização (BOWE *et al.*, 2014). A glicemia de jejum foi coletada no 4o e 8o mês de experimento.

3.5 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

O ipITT foi realizado no 4o e no 8o mês. Após a verificação da glicemia de jejum (6 horas de jejum, ração retirada as 7:00) com aparelho Accu-Check Advantage II, foi administrada insulina regular humana na cavidade peritoneal na dose de 0,5U/kg de peso corpóreo. A glicemia foi verificada nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. A constante do *clearance* da glicose (*kitt*) foi calculada usando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. A glicose $t_{1/2}$ foi calculada usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (BOWE *et al.*, 2014).

3.6 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Assim como o ipITT, o ipGTT foi realizado no 4o e 8o mês. Os camundongos foram mantidos em jejum por 8 h (ração retirada as 7:00) e após a verificação da glicemia com o aparelho Accu-Check Advantage II, foi administrada na cavidade peritoneal uma solução de glicose 20%

(2,0 g/Kg de peso corpóreo). A glicemia foi verificada nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (BOWE *et al.*, 2014). As áreas sob as curvas de glicose sanguínea ($AUC = \text{mg/dL} \times 120 \text{ min}$) durante o GTT e foram calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS *et al.*, 1990) utilizando o Software ORIGIN 6.0 (1999).

3.7 Eutanásia

No final do décimo mês, os camundongos foram previamente anestesiados por CO₂ e então eutanasiados por decapitação. A eutanásia aconteceu no período da tarde, e os animais encontravam-se no estado alimentado.

3.8 Estatística

Os resultados foram analisados pela análise de variância para medidas repetidas ou teste t-student utilizando o *software* GraphPad Prism 5. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Neste trabalho avaliamos os parâmetros metabólicos e comportamentais de camundongos a medida que envelheciam (do desmame ao 10º mês de vida).

Iremos apresentar primeiramente os resultados a respeito da evolução da massa corporal e da ingestão alimentar dos animais, representados pela **Figura 3** e **Figura 4**, respectivamente. Em relação a **Figura 3** podemos observar um aumento da massa corporal ao longo dos meses até o 6º mês, período à partir do qual a massa corporal se estabiliza, comparando o 1º mês com o 10º mês observamos um aumento significativo da massa corporal ($p < 0,001$). Na **Figura 4**, apresentamos o gráfico de ingestão alimentar. Podemos ver que no 1º mês do experimento, os animais apresentavam uma ingestão alimentar muito alta, tendo uma queda progressiva durante os meses subsequentes. Comparando o 1º mês com o 10º, tivemos uma redução significativa da ingestão alimentar dos animais ($p < 0,001$).

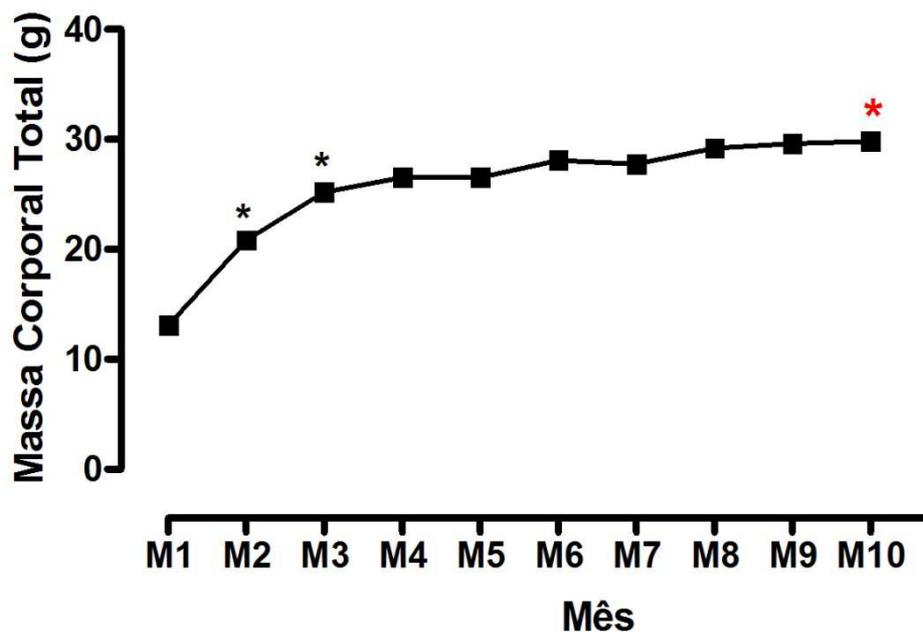


Figura 3 – Evolução da massa corporal dos camundongos durante o período de 10 meses.

Evolução da massa corporal de camundongos durante o período de 10 meses. N = 10 camundongos. ANOVA para medidas repetidas. * $p < 0,005$ em relação ao mês anterior. * $p < 0,001$ em relação ao mês 1.

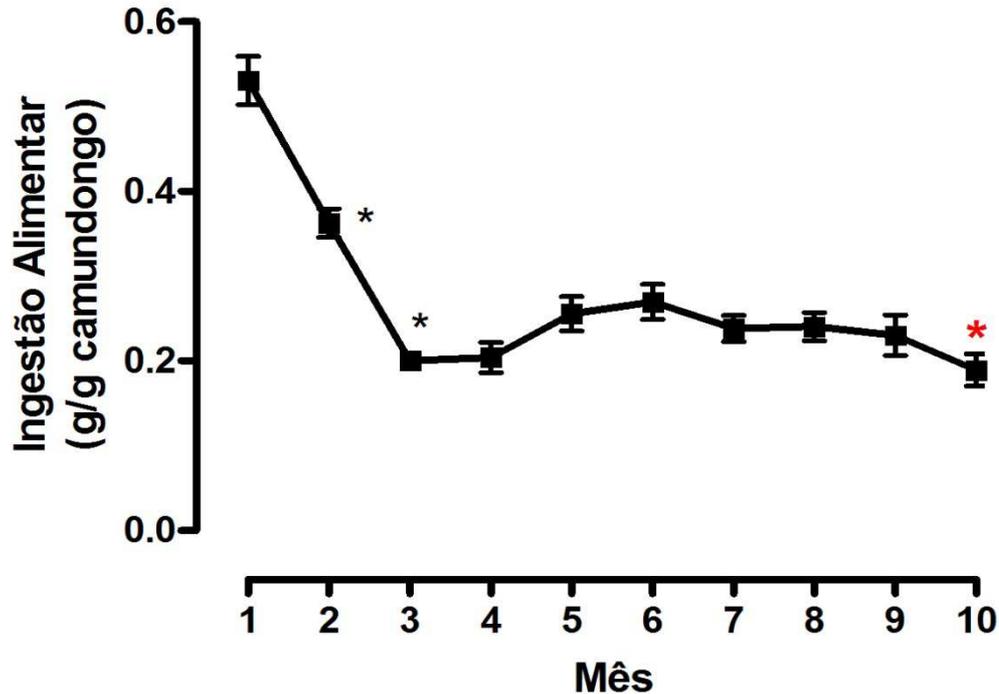


Figura 4 - Evolução da ingestão alimentar pelo período de 10 meses

Ingestão alimentar relativa de camundongos pelo período de 10 meses. N = 10 camundongos. ANOVA para medidas repetidas. * $p < 0,005$ em relação ao mês anterior. * $p < 0,001$ em relação ao mês 1.

Na **Figura 5**, apresentamos os dados relativos a atividade física espontânea (SPA) de nossos animais no 1º, 4º, 8º e 10º mês. As faixas cinzas nos gráficos correspondem ao período escuro do ciclo (19:00 às 7:00). Podemos observar picos na atividade dos camundongos na fase escura, característica dos roedores. Com o envelhecimento dos animais houve uma redução da atividade física espontânea. Para confirmar essa redução, foi feita a análise da área abaixo da curva (AUC) da atividade física espontânea no período escuro do ciclo. As médias da AUC estão representadas pela **Figura 6**. Neste gráfico (**Figura 6**), podemos observar uma redução significativa ($p < 0,001$) da atividade física espontânea a partir do 8º mês.

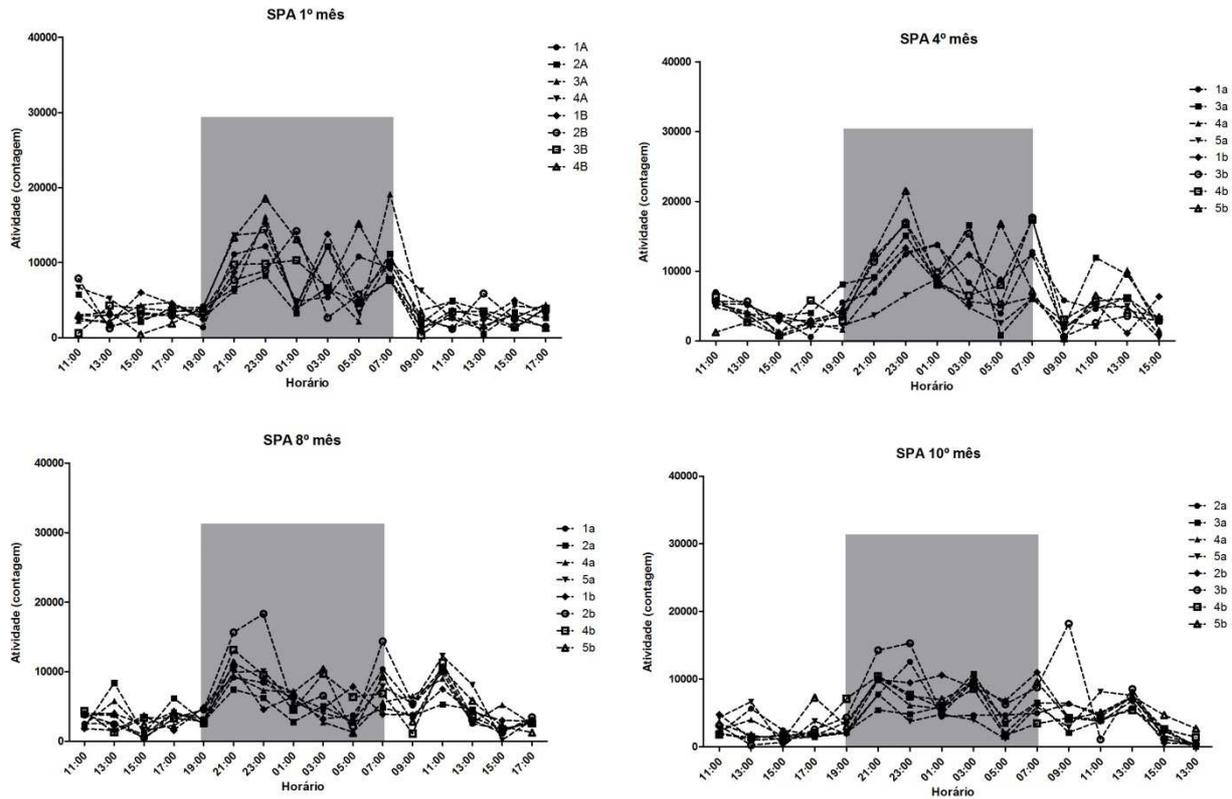


Figura 5- Representação da atividade física espontânea nos meses 1º, 4º, 8º e 10º.

Representação da atividade física espontânea 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida. A área em cinza corresponde ao período escuro do ciclo (19:00 – 7:00). N = 8 camundongos.

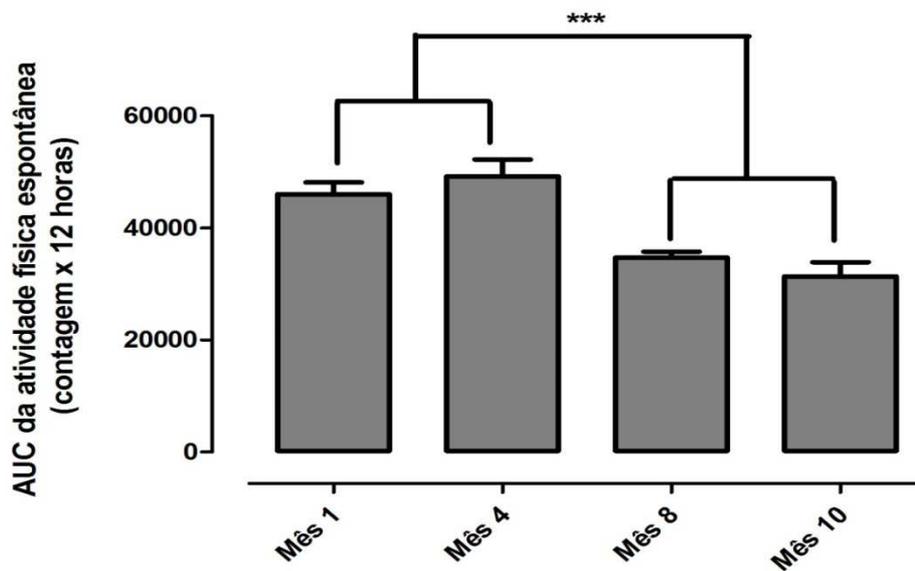


Figura 6- Área abaixo da curva: Atividade física espontânea

Área abaixo da curva (AUC) da atividade física espontânea de camundongos no período escuro do ciclo (19:00 – 7:00). Os animais foram avaliados no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida. N = 8 camundongos. ANOVA para medidas repetidas. *** $p < 0,001$.

Os valores do quociente respiratório no 1º, 4º, 8º e 10º mês, utilizados para cálculo da flexibilidade metabólica dos camundongos, estão apresentados na **Figura 7**. Como para a atividade física espontânea, as faixas cinzas nos gráficos correspondem ao período escuro do ciclo (19:00 às 7:00). Conforme descrito em “Métodos”, para determinarmos a flexibilidade metabólica (Δ QR,) calculamos a diferença entre o quociente respiratório (QR) na fase escura e clara do ciclo. No ciclo escuro podemos observar um predomínio do uso de carboidratos (coeficiente respiratório mais próximo de 1), enquanto no ciclo claro a utilização de lipídeos aumenta. O QR ao longo de um ciclo completo (claro e escuro) foi semelhante no 1º, 4º e 10o mês, porém observamos um aumento muito pronunciado no 8º mês. Isso foi confirmado pelas análises de Δ QR, representadas na **Figura 8**.

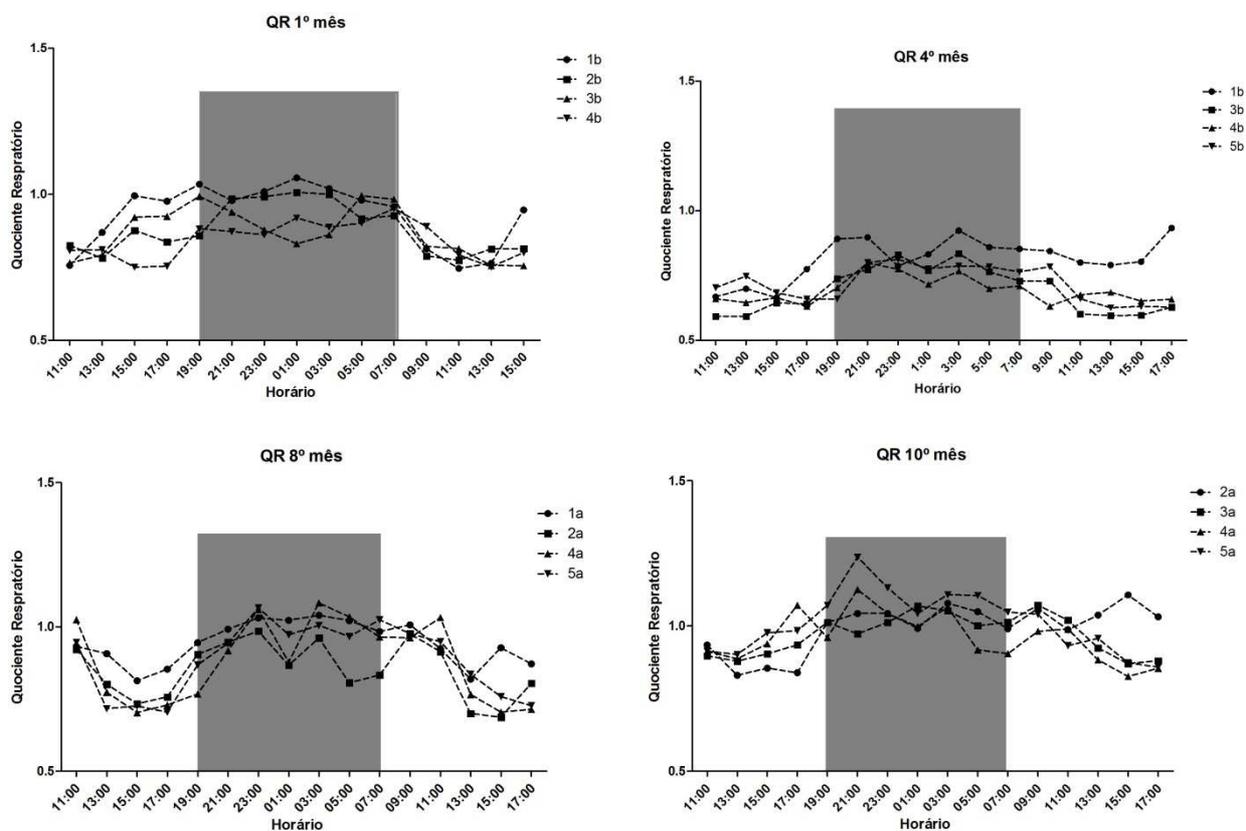


Figura 7- Representação do quociente respiratório de camundongos no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida .

Quociente respiratório de camundongos no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida . A área cinza corresponde ao período escuro do ciclo (19:00 – 7:00). Os gráficos mostram a análise feita em 4 camundongos, mas 8 camundongos foram avaliados em cada momento.

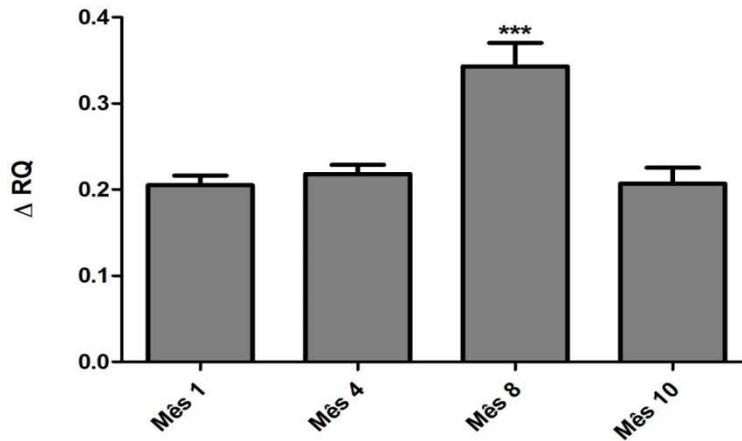


Figura 8 - Flexibilidade Metabólica de camundongos no 1º, 4º, 8º, 10º meses de vida.

Flexibilidade metabólica (Δ QR) de camundongos no 1º, 4º, 8º, 10º meses de vida. O Δ QR foi calculado subtraindo-se o menor valor do coeficiente respiratório (que ocorre no ciclo escuro). N = 8 camundongos. ANOVA para medidas repetidas. *** p < 0,001.

Os valores glicêmicos obtidos durante o teste de tolerância á insulina no 4º e 8º mês são mostrados na **Figura 9**. Podemos observar que após a injeção intraperitoneal de insulina, no 4º mês a glicemia cai de forma mais rápida do que no 8º mês (**Figura 9A**). Isso se refletiu na análise da taxa de remoção de glicose (kITT), que foi significativamente menor (p = 0,002) no 8º em comparação ao 4º mês (**Figura 9B**). Isso indica que os animais no 8º mês tiveram uma diminuição significativa na sensibilidade à insulina.

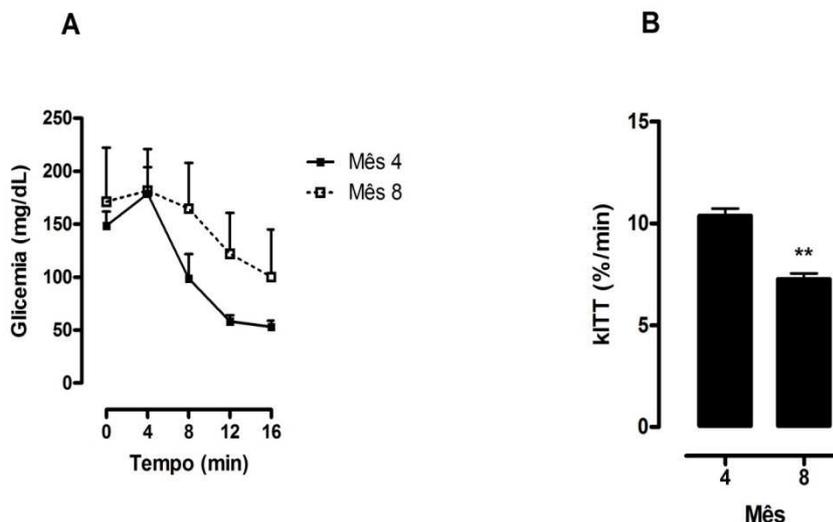


Figura 9. Teste de tolerância à insulina e taxa de remoção de glicose (kITT) no 4º e 8º mês de idade dos camundongos.

(A) Glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) nos meses 4º e 8º e (B) Taxa de remoção de glicose (kITT) no ipITT de camundongos aos 4 e 8 meses de vida. N = 10 camundongos. Teste t student. ** p < 0,01.

Na **Figura 10**, apresentamos os gráficos do gasto energético dos camundongos nos meses 1, 4, 8 e 10. As faixas cinzas representam o período escuro do ciclo (19:00 às 7:00). Podemos observar que o gasto energético dos animais é maior durante a fase escura, já que eles apresentam um pico de atividade nesse período. Porém, com o processo de envelhecimento, observamos uma redução do gasto energético, como demonstrado pela área abaixo da curva do gasto energético na fase escura (**Figura 11**). Podemos observar uma redução significativa do gasto energético no 8º e 10º mês em comparação ao 1º e ao 4º mês. O gasto energético ainda foi maior no 8º mês em comparação ao 10º mês.

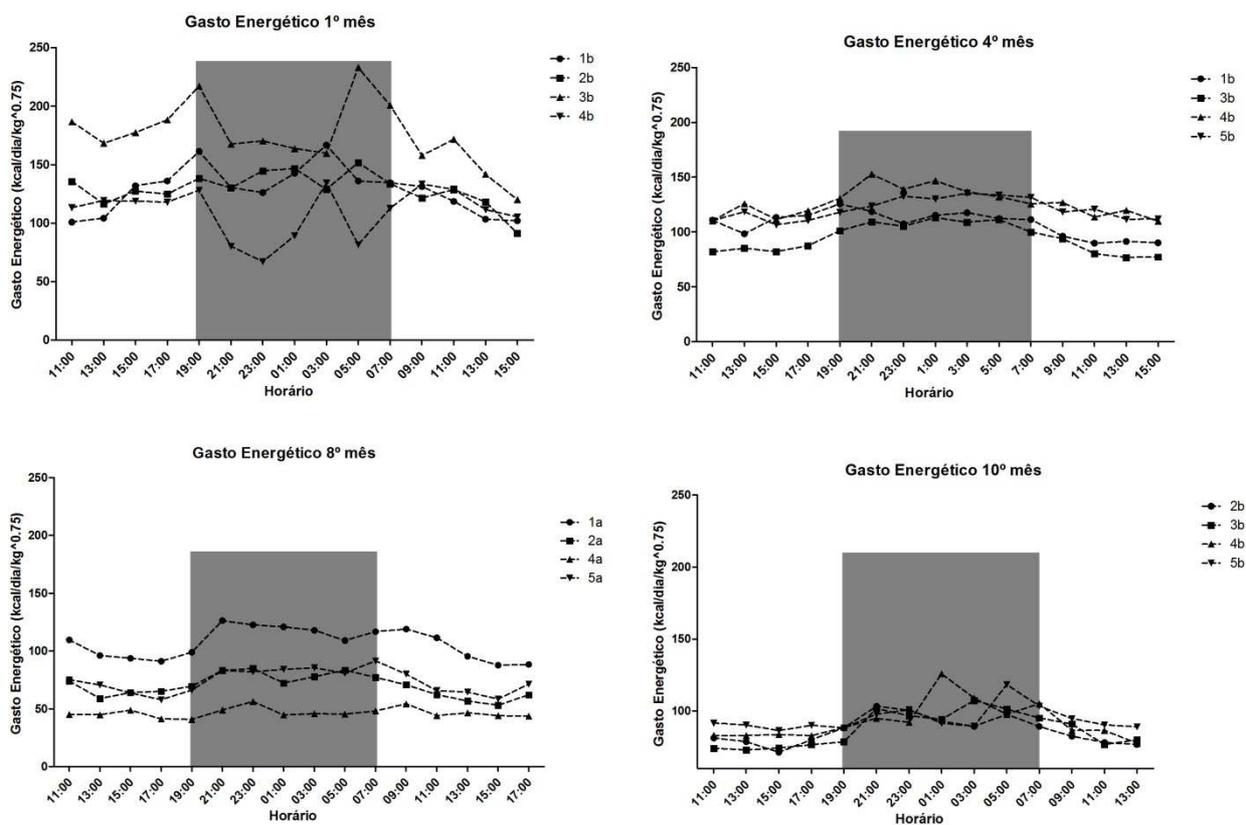


Figura 10 – Gasto energético de camundongos no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida.

Gasto energético de camundongos no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida. A área cinza corresponde ao período escuro do ciclo (19:00 7:00). Os gráficos mostram a análise feita em 4 camundongos, mas 8 camundongos foram avaliados em cada momento.

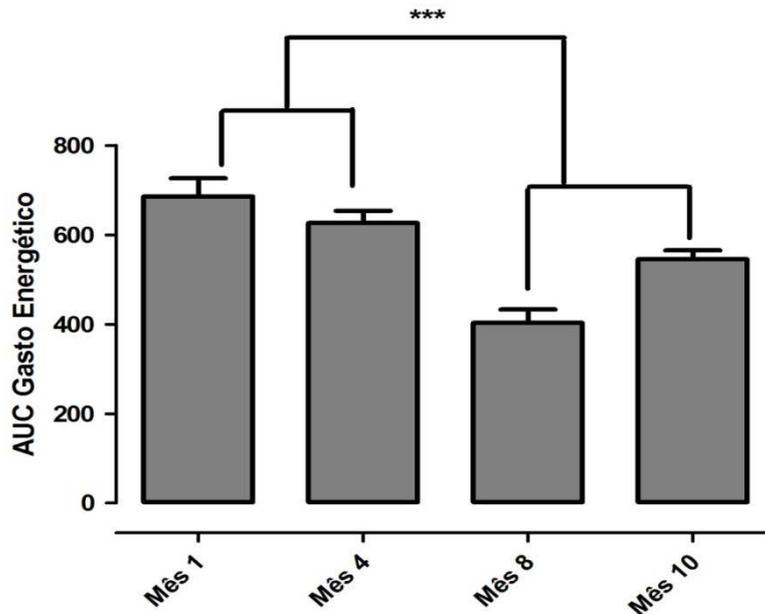


Figura 11- Área abaixo da curva (AUC) do gasto energético de camundongos.

Área abaixo da curva (AUC) do gasto energético de camundongos no período escuro do ciclo (19:00 – 7:00). Os animais foram avaliados no 1º, 4º, 8º e 10º meses de vida. N = 8 camundongos. ANOVA para medidas repetidas. *** p < 0,001.

Os parâmetros metabólicos que avaliam a homeostase glicêmica são apresentados nas **Figuras 12 e 13**. Na **Figura 12** encontram-se os resultados da glicemia de jejum. Podemos observar um aumento da glicemia dos camundongos no 8º mês em comparação ao 4º mês, de forma significativa (p = 0,0012). Na **Figura 13A** são mostrados os valores glicêmicos durante teste de tolerância à glicose (GTT) realizado no 4º e 8º mês, e a **Figura 13B** representa a média da área abaixo da curva glicêmica durante o teste. No 8º mês podemos observar um aumento mais pronunciado da glicemia após administração intraperitoneal de glicose. A glicemia permaneceu mais elevada durante todo o teste nos animais aos 8 meses de idade quando comparados a eles próprios 4 meses mais jovens, ou seja, a tolerância à glicose se deteriorou do 4º para o 8º mês (**Figura 13A**). Isso foi confirmado pela análise da área abaixo da curva glicêmica, que foi significativamente maior no 8º mês em comparação ao 4º mês (p = 0,003), conforme apresentado na **Figura 13B**.

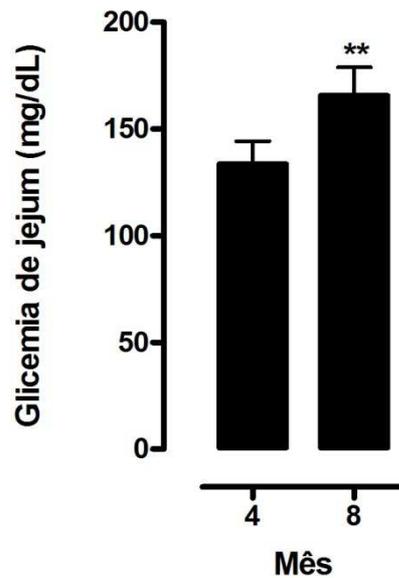


Figura 12 – Glicemia de jejum de camundongos aos 4 e 8 meses de idade.

Glicemia de jejum de camundongos aos 4 e aos 8 meses de vida. N = 10 camundongos. Teste t student. **p < 0,01.

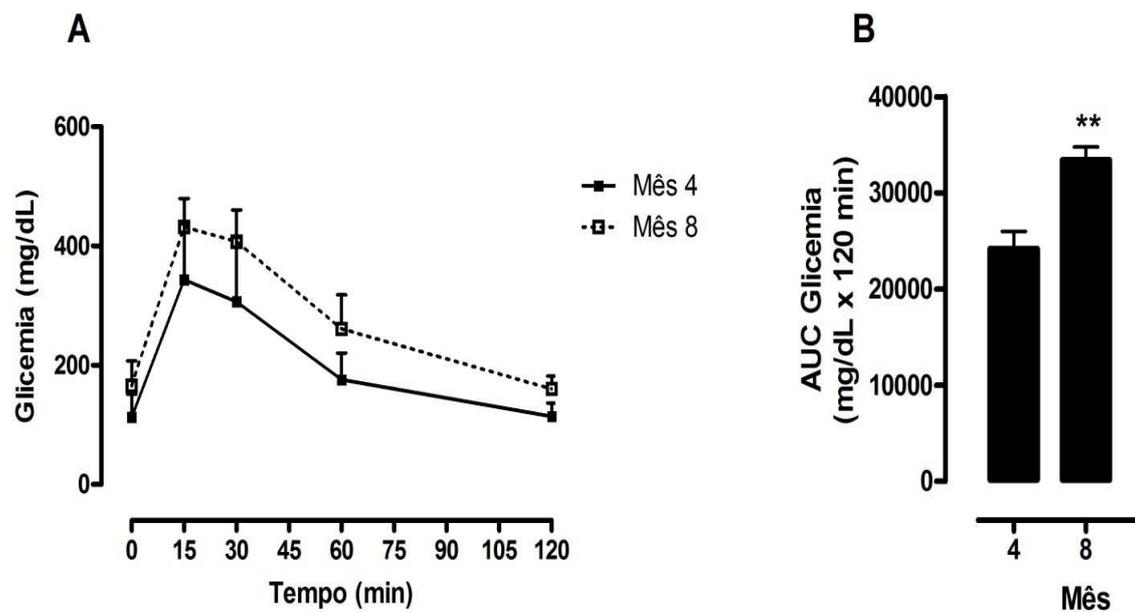


Figura 13 - (A) Teste de tolerância à glicose (GTT) nos meses 4º e 8º e (B) Média da área abaixo da curva (AUC) durante o GTT.

(A) Glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) nos meses 4º e 8º e (B) Área abaixo da curva glicêmica (AUC) de camundongos durante o ipGTT aos 4 e aos 8 meses de vida. N = 10 camundongos. Teste t student. ** p < 0,01.

5. DISCUSSÃO

O envelhecimento populacional aumenta a cada década e já é previsto para o Brasil nos próximos anos um quadro de “crescimento zero” (IBGE, 2008). Estudar as mudanças fisiológicas e metabólicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento é de extrema importância para que se chegue com plenitude e qualidade de vida na fase idosa. O envelhecimento está associado com o aparecimento de muitas doenças crônicas e metabólicas, como: doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e síndrome metabólica (MICHALAKIS *et al.*, 2013).

Em relação aos nossos dados a respeito da massa corporal, conseguimos observar um aumento significativo entre o 1º mês e 10 meses. Porém, temos que levar em consideração que os animais começaram o experimento com 21 dias de idade, ou seja, era esperado que no fim do 10º mês os animais apresentassem um aumento da massa corporal, devido ao crescimento natural dos mesmos. Quando observamos a evolução da massa corporal (Figura 3), podemos ver que o ganho de massa corporal só foi significativo nos três primeiros meses, após esse período, a massa corporal se manteve estabilizada. Já é bem descrito na literatura, que conforme o processo de envelhecimento há um aumento da massa corporal (CAVALCANTI *et al.*, 2010 ; HUGHES *et al.*, 2002). Porém, quando falamos da composição corporal na fase idosa, existe uma diminuição da massa magra e aumento do tecido adiposo sem necessariamente afetar a massa corporal total (MICHALAKIS *et al.*, 2013).

Em relação à ingestão alimentar dos nossos animais, observamos uma redução significativa da ingestão de ração, quando comparamos o 1º mês e 10º mês. Esse achado vai de acordo com publicações na literatura, onde animais e humanos apresentam uma diminuição da ingestão alimentar conforme vão envelhecendo (KMIEC, 2010). Essa diminuição da ingestão alimentar ocorre devido a uma diminuição dos peptídeos orexígenos hipotalâmicos e dos hormônios orexígenos (KMIEC, 2010). Os peptídeos orexígenos hipotalâmicos que sofrem uma diminuição durante o processo de envelhecimento são: AgRP, NPY, orexina A e B e MCH. Estes peptídeos encontram-se no núcleo hipotalâmico lateral, também conhecido como o “centro da fome” (KMIEC, 2010). No envelhecimento também há o surgimento de um quadro chamado “anorexia do envelhecimento”, caracterizada pela diminuição do consumo alimentar, que foi observada tanto em humanos como animais de laboratório (MORLEY, 2003).

Existe uma hipótese de que a diminuição da ingestão de alimentos é causada pela adaptação fisiológica em resposta da diminuição gradual da atividade física e do gasto energético que ocorre no envelhecimento (KMIEC, 2010).

Nossos resultados a respeito do gasto energético e atividade física espontânea indicam uma diminuição gradual de ambos. O gasto energético apresentou uma maior redução no 8º mês de análise. Fazendo uma análise do 1º ao 10º de vida, podemos observar uma redução progressiva do gasto energético. Essa redução do gasto energético também foi acompanhada por uma redução da atividade física espontânea.

Como mencionado na seção 1.3, o gasto energético pode ser dividido em três categorias principais: funções fisiológicas e celulares básicas que requerem ATP (termogênese de repouso), o efeito térmico do alimento e a termogênese induzida pela atividade física (LEVINE, 2004). A taxa metabólica basal ou termogênese de repouso sofre uma redução de 1% a 2% por década após os 20 anos de idade (MANINI, 2010). Além disso, ela é primordial para a manutenção da homeostase do organismo e vem sendo muito estudada, pois o seu aparelho de medição em humanos é barato e o tempo de medição é relativamente curto (30 à 60 minutos) (MANINI, 2010).

A taxa metabólica basal mantém-se menor mesmo após as correções para as diferenças da composição corporal (MANINI, 2010 ; KREMS *et al.*, 2005). Estudos apontam que além das alterações da composição corporal ocasionadas pela idade, o envelhecimento também pode estar associado a uma diminuição da taxa metabólica basal por unidade de tecido, ou seja, a diminuição da taxa metabólica basal durante o envelhecimento não ocorre apenas por mudanças na composição corporal (KREMS *et al.*, 2005).

Em relação aos nossos resultados sobre a atividade física espontânea, observamos uma redução progressiva dessa atividade, sendo mais significativa no 8º mês (concomitantemente ao gasto energético). Essa diminuição da atividade física espontânea durante o processo de envelhecimento vai de acordo com achados na literatura, onde outros autores também encontraram essa diminuição tanto humanos como em modelos animais (MICHALAKIS *et al.*, 2013 ; VALES *et al.*, 2013). A grande responsável pela variabilidade entre o gasto energético total entre os indivíduos, independente de diferenças no tamanho do corpo, é devido à variabilidade no grau de atividade física espontânea, que responde por 100-800 kcal/dia (THOBURN & PROIETTO, 2000). A atividade física espontânea é regulada pelo sistema nervoso central, principalmente pelo hipotálamo (THOBURN & PROIETTO, 2000). Roedores com lesão induzida no hipotálamo ventromedial (sem afetar o núcleo hipotalâmico paraventricular) apresentaram uma diminuição da atividade física espontânea (TOKUNAGA *et al.*, 1991). Uma das explicações para a diminuição da atividade física espontânea durante o envelhecimento é uma diminuição da atividade do sistema nervoso central (THOBURN & PROIETTO, 2000). Lesões no núcleo hipotalâmico lateral, além de diminuir a atividade física espontânea, também resultam em uma diminuição da ingestão alimentar (KOTZ, 2006b). A orexina (neuropeptídeo orexígeno), além de exercer um papel importante no comportamento alimentar, também pode ser mediador da atividade física espontânea

(KOTZ, 2006b) e como mencionado anteriormente, durante o envelhecimento existe uma diminuição desse neuropeptídeo (KMIEC, 2010).

O hormônio insulina tem papel fundamental na manutenção da homeostase energética, e seu efeito sobre a ingestão alimentar é bem estabelecido (MURRAY *et al.*, 2014). Entretanto, ela também parece afetar a atividade física espontânea. A administração intracerebroventricular de insulina aumenta a atividade física, mas esse efeito é abolido em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, provavelmente como consequência da resistência central a esse hormônio que eles desenvolveram (HENNIGE *et al.*, 2009). Isso nos motivou a investigar a relação entre sensibilidade à insulina e atividade física espontânea no processo de envelhecimento.

A respeito da flexibilidade metabólica de nossos animais, era esperada uma diminuição da mesma, já que os nossos resultados de sensibilidade à insulina (avaliada pelo teste de tolerância a esse hormônio) apontaram uma diminuição da sua ação no 8º em comparação ao 4º mês. Porém, observamos um aumento significativo da flexibilidade metabólica no 8º mês de análise, com retorno, no 10º mês, aos valores encontrados nos animais mais jovens. Esse achado nos faz acreditar que o protocolo utilizado nesse trabalho para determinação da flexibilidade metabólica não foi o mais adequado. Aqui optamos por permitir que os camundongos tivessem livre acesso ao alimento, avaliando dessa forma a utilização de substratos energéticos em condição normal. Protocolos empregando períodos de jejum ou desafios com insulina ou dieta contendo teor elevado de lipídeos poderiam se mostrar mais sensíveis em detectar alterações na sensibilidade à insulina utilizando esse método (GALGANI *et al.*, 2008). Além disso, o protocolo que utilizamos não avalia a sensibilidade à insulina de maneira central e sim periférica.

Conforme mencionado acima, a flexibilidade metabólica é um indicador de sensibilidade à insulina. Um indivíduo com uma boa capacidade de oxidar os substratos disponíveis tanto em jejum como em estado alimentado, é considerado metabolicamente flexível (KELLEY, 2005). Mudanças no estilo de vida (prática de atividade física e nutrição adequada) mudam de forma positiva a flexibilidade metabólica (CORPELEIJIN, 2009). O aumento dos níveis de atividade física, melhora a capacidade do músculo esquelético de oxidar ácidos graxos durante o próprio exercício, assim como melhora a oxidação de gordura no estado de jejum (CORPELEIJIN, 2009).

Os principais fatores determinantes da flexibilidade metabólica são: QR basal, taxa de disponibilidade de glicose, concentração plasmática de ácido graxo, capacidade de armazenamento de lipídios no tecido adiposo e capacidade oxidativa da mitocôndria (GALGANI, 2008). Durante o envelhecimento, há um aumento da resistência à insulina (DEFRONZO, 1979; FINK *et al.*, 1983), ou seja, conforme o processo de envelhecimento, o indivíduo torna-se gradativamente metabolicamente inflexível. Uma hipótese para a inflexibilidade metabólica relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 e a resistência à insulina, são resultados de anormalidades mitocondriais (

GALGANI, 2008). A menor capacidade mitocondrial está associada com uma diminuição da oxidação de gordura, causando, portanto, aumento do acúmulo de lipídeos no músculo. Existe possibilidade de que a disfunção mitocondrial possa estar relacionada com baixa atividade física em indivíduos metabolicamente inflexíveis (GALGANI, 2008)

Em relação à homeostase glicêmica dos nossos animais, nos testes de tolerância à glicose (GTT), tolerância à insulina (ITT) e taxa de remoção de glicose (KITT), foi constatado o desenvolvimento de intolerância à glicose e uma diminuição da sensibilidade à insulina. Esses achados vão de acordo com a nossa hipótese, de que a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose são sensíveis ao processo de envelhecimento e de que existe uma relação temporal entre redução da sensibilidade a esse hormônio e diminuição da atividade física espontânea. Porém, o mecanismo exato que explique a relação envelhecimento *versus* intolerância à glicose e resistência à insulina ainda não são exatamente claros (CHANG & HALTER, 2003). A elucidação desse processo poderia trazer contribuições também para o melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na regulação da atividade locomotora.

Uma das prováveis causas para a alta prevalência intolerância à glicose em pessoas idosas, pode ser devido a disfunções na função pancreática conforme o avanço da idade (DE TATA, 2014). A célula beta apresenta uma alta capacidade proliferativa em roedores e com a senescência essa capacidade da célula beta vai diminuindo (DE TATA, 2014). Alguns fatores são responsáveis para essa diminuição da função pancreática, tais como: disfunções na mitocôndria, redução dos níveis de GLUT 2, acúmulo de produtos de glicação avançada, resposta reduzida ao GLP-1 e diminuição do influxo de cálcio dentro da célula pancreática (DE TATA, 2014). No que diz respeito à resistência à insulina no envelhecimento, os fatores envolvidos seriam: obesidade, sarcopenia, mudanças hormonais decorrentes da idade, estresse oxidativo, inflamação e redução da atividade física (MICHALAKIS *et al.*, 2013; DE TATA, 2014). Chamamos a atenção, contudo, para o fato de que no contexto da atividade física espontânea, as alterações que mais contribuiriam com a sua redução seriam os associados a resistência central (hipotalâmica) a esse hormônio.

6. CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados podemos concluir que o fenômeno já conhecido de resistência à insulina que ocorre com o envelhecimento associa-se temporalmente com a queda dos níveis de atividade física espontânea. Isso reforça a hipótese de que esse hormônio atue na regulação desse componente do gasto energético. Intervenções que busquem a prevenção ou o combate à resistência à insulina poderiam, dessa forma, evitar ou minimizar a redução da atividade física espontânea que acontece com o envelhecimento e ter repercussões positivas na composição corporal e no metabolismo. Nossos dados também nos permitem concluir que o protocolo usado para determinação da flexibilidade metabólica em camundongos, com livre acesso ao alimento, parece não ser o mais adequado para avaliar a sensibilidade à insulina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

BAHLS, L.D. *et al.*. Avaliação do consumo de uma baixa quantidade diário de soja no estresse oxidativo, no perfil lipídico e inflamatório e na resistência a insulina em pacientes com síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.55, n.6, p. 399-405, 2011.

BANDARU, S.S. *et al.*. Effects of PI3K inhibition and low docosahexaenoic acid on cognition and behavior. **Physiology & Behavior**, v.100, n.3, p. 239-244, 2010.

BARSH, GS; SCHWARTZ, MS. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 8, p. 589-600, 2002

BOOTH, F.W. *et al.*. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, v.88, n.2, p.774-787,2000.

BOOTH,F.W. *et al.*. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1,p.3-30,2002.

BOWE, J.E. *et al.*. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal Endocrinology**, v.222, n. 3, p. G13-25, 2014.

BROOKS, G.A; FAHEY, T.D; BALDWIN, K.M. **Fisiologia do exercício: bioenergética humana e suas aplicações**. 4º edição, Califórnia: Phorte, 2013.

CASPERSEN, C.J., POWELL, K.E.; CHRISTENSON, G.M. Physical activity, exercise and physical fitness. **Public Health Reports**, v. 100, n.2, p. 126-131, 1985.

CAVALCANTI, C. *et al.*. Envelhecimento e Obesidade: Um grande desafio para o século 21. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14 , n.2, p. 87 -92, 2010.

CARVALHEIRA, J.B.C. *et al.*. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v.46, n.12, p.1629–1640, 2003.

CHAKRAVARTHY, M.V.; BOOT, F.W. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n.1, p.3-10, 2004.

CHANG, A.M & HALTER, J. B. Aging and insulin secretion. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 1, p. E7 – E12, 2003.

CEFALU, W.T. *et al.*. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. **Metabolism**, v.44, n.7, p.954–959, 1995.

CORPELEIJIN, E; SARIS, W.H. M; BLAAK, E. E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. **Obesity Reviews**, v. 10, n.1, p. 178-193, 2009.

- DALFOVO, M.S; LANA, R. A.; SILVEIRA, A. Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico. **Revista Interdisciplinar Científica Aplicada**, v.2, n.4, p.01-13, 2008.
- DAVIDSON, M.B. The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. **Metabolism**, v.28, n.6, p.688-705, 1979.
- DEFRONZO, R.A. Glucose Intolerance and Aging: Evidence for Tissue Insensitivity to Insulin. **Diabetes**, v. 28, n.12, p.1095-1101, 1979.
- DE TATA, V. Age-related impairment of pancreatic beta-cell function: pathophysiological and cellular mechanisms. **Frontiers in Endocrinology**, v. 138, n. 5, p. 1-8, 2014.
- DUARTE, A.C.G. *et al.*. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.
- FARINATTI, P.T.V. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.8, n.4, p.129-138, 2002.
- FINK, R.I. Mechanisms of Insulin Resistance in Aging. **Journal Clinical Investigation**, v.71, n.6, p.1523-1535, 1983.
- GALGANI, J.E. *et al.*. Metabolic flexibility and insulin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.295, n.5, p.E1009–E1017, 2008.
- HALLAL, P.C. *et al.*. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p.247-257, 2012.
- HALLSCHMID, M.; SCHULTES, B. Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders?. **Diabetologia**, v.52, n.11, p.2264-2269, 2009.
- HENNIGE, A.M. *et al.*. Insulin-mediated cortical activity in the slow frequency range is diminished in obese mice and promotes physical inactivity. **Diabetologia**, v.52, n.11, p.2416-2424, 2009.
- HUGHES, V.A. *et al.*. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. **American Journal Clinical Nutrition**, v.76, n.2, p.473–81, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Brazilian population aging is in an accelerated rhythm and will stop increasing in 30 years. **Social Communication**, November 27, 2008.
- KELLEY, J. Skeletal muscle fat oxidation : timing and flexibility are everything. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n. 7, p. 1699-1702, 2005.
- KMIEC, Z. Central Control of Food Intake in Aging. **Interdisciplinary Topics in Gerontology**, v. 37, n.1, p. 37-50, 2010.
- KOTZ, C.M *et al.*. Orexin A mediation of time spent moving in rats: neural mechanisms **Neuroscience**, v.142, n.1, p. 29-36, 2006a.

KOTZ, C.M *et al.*. Integration of feeding and spontaneous physical activity: Role for orexin **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 3, p. 294-301, 2006b.

KREMS, C. *et al.*. Lower resting metabolic rate in the elderly may not be entirely due to changes in body composition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n.1 , p. 255-262, 2005.

LEE, I. *et al.*. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The Lancet**, v.380, n.9838, p.219-229, 2012.

LENARD, N.R.; BERTHOUD, H.R. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. **Obesity**, v.16, n.S3, p.S11-S22, 2008.

LEVINE, J.A. *et al.*. Role of Nonexercise Activity Thermogenesis in Resistance to Fat Gain in Humans. **Science**, v. 283, n.5399, p.212-214, 1999.

LEVINE, J.A. **Non exercise activity thermogenesis (NEAT): environment and biology.** American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v. 286, n.5, p.E675-685, 2004.

MANINI, T. M. Energy Expenditure and Aging. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 1 – 26, 2010.

MENÉNDEZ, J.A ; ATRENS, D.M. Glucagon and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. **Brain Research**, v.630, n.1-2, p.245-251, 1993.

Meijer, G. A. *et al.* The effect of a 5-month endurance-training programme on physical activity: evidence for a sex-difference in the metabolic response to exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 62, n.1, p. 11-17, 1991.

MICHALAKIS, K. *et al.*, Obesity in the ageing man. **Metabolism**, v. 62 , n. 10 . 1341 – 1349, 2013.

MOORE, S.C. *et al.*. Leisure Time Physical Activity of Moderate to Vigorous Intensity and Mortality: A Large Pooled Cohort Analysis. **PLoS Medicine**, v.9, n.11, p.1-14, 2012.

MORIO, B. *et al.*. Effects of 14 weeks of progressive endurance training on energy expenditure in elderly people. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 511-519, 1998.

MORLEY, J. E. Anorexia and Weight Loss in Older Persons. **Journals of Gerontology: Series A**, v. 58, n. 2, p. M131 – M137, 2003.

MURRAY, S. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n.9, p. 540-552, 2014.

NAÇÕES UNIDAS. Population Division, DESA, World Population Ageing 1950-2050, 2001.

- NETTO, F. Aspectos biológicos e fisiológicos do envelhecimento humano. **Pensar á prática**, v.7, n.1, p.75-84, 2004.
- NICCOLI, T. & PARTRIDGE, L. Ageing as a Risk Factor for Disease. **Current Biology**, v.22, n.17, p.741–R752, 2012.
- NISWENDER, K.D.; SCHWARTZ, M.W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiology and intracellular signaling capabilities. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.24, n.1, p.1-10, 2003.
- NOVAK, C.M ; LEVINE, J.A. Central Neural and Endocrine Mechanisms of Non-Exercise Activity Thermogenesis and Their Potential Impact on Obesity. **Jornal Neuroendocrinology**, v.19, n.12, p.923-940, 2007.
- OLIVEIRA, C.A.M. *et al.*. Características do Diabetes Mellitus induzido pela administração neonatal de aloxana em ratos. **Bioscience Journal**, v.20, n.2, p.93-102, 2004.
- PÁDUA, M.F. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.3, p. 179-184, 2009.
- PANVELOSKI-COSTA, A.C. *et al.*. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade a insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 2, p. 155-163, 2011.
- PEDRINELLI, A.; LEME, G.; NOBRE, R.S.A. O efeito da atividade física no aparelho locomotor do idoso. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.44, n.2, p.96-101,2009.
- POEHLMAN, E. T. ; GARDNER, A.W. ; GORAN, M.I. Influence of endurance training on energy intake, norepinephrine kinetics, and metabolic rate in older individuals. **Metabolism**, v. 41, n. 9, p.941 – 948, 1992.
- RAMOS, L.R. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso São Paulo. **Caderno Saúde Pública**, v. 19, n.3, p.93 -98, 2003.
- SOLANO, L. *et al.*. Leptina e insulina sérica en adultos con sobrepeso y obesos em régimen hipocalórico com alto contenido de carbohidratos complejos. **Revista Chilena de Nutrición**, v.36, n.2, p. 129-135, 2009.
- THOBURN, A.W & PROIETTO, J. Biological determinants of spontaneous physical activity. **Obesity Reviews**, v.1, n. 1, p. 87-94, 2000.
- TOKUNAGA, K. *et al.*. PVN-lesioned obese rats maintain ambulatory activity and its circadian rhythm. **Brain Research Bulletin**, v. 26, n. 3, p. 393–396, 1991.
- WESTERTERP, K.R. Daily physical activity and ageing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.3, n.6, p.485-488, 2000.
- WESTERTERP, K.R; MEIJER, E.P. Physical activity and parameters of aging: a physiological perspective. **Journals of Gerontology: Series A**, v.56, n.2, p.7-12, 2001.

VAISBERG, M. Exercício na Terceira idade. In: COHEN, M. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP- EPM**. 1º ed. Barueri: Manole, 2008. p.213-224.

VALLES, G. *et al.*. Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. **Longevity & Healthspan**, v.2, n.1, p. 2-14, 2013.

VELLOSO, L.A. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, n.2, p.151-158, 2009.

WILD, S. *et al.*. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, vol.27,n.5, p.1047–1053, 2004.

WYNNE, K. *et al.*. Appetite Control. **Journal Endocrinology**, vol.184, n.2, p.291-318, 2005.

YAMADA, T.M. *et al.*. Modelo de calorímetro indireto experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.4, n.1, p.30-35, 1989.

8. ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 20 de maio de 2014
CEUA N 8191200114

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Camila Aparecida Machado De Oliveira
Depto/Disc: Departamento De Biociências

Título do projeto: "CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA ESPONTÂNEA E FLEXIBILIDADE METABÓLICA DE CAMUNDONGOS DURANTE O ENVELHECIMENTO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O Brasil caminha rapidamente para um perfil demográfico cada vez mais envelhecido. Com o aumento da idade ocorre uma mudança da composição corporal, com declínio da massa livre de gordura e aumento da massa de tecido adiposo. Assim, além das implicações econômicas que o envelhecimento populacional traz, ele é um importante fator de risco para várias doenças, incluindo o diabetes melitus tipo 2. A redução no nível de atividade física que acompanha o processo de envelhecimento pode contribuir tanto para essa alteração da composição corporal quanto para as doenças metabólicas cuja prevalência aumenta com a idade. A inatividade física está associada à mortalidade prematura e a redução da inatividade física global evitaria milhares de mortes por ano. Dessa forma evidencia-se a importância de estudos que busquem compreender os mecanismos que regulam a atividade física. A atividade física pode ser classificada em exercício voluntário (esportes, academia), e atividade física espontânea (SPA - movimentos corporais para realização de atividades rotineiras), que pode representar mais de 50% da energia total diária gasta. O hipotálamo é o centro regulador da homeostase energética, e recebe e integra sinais do status energético do corpo, como a insulina. Esse hormônio tem como efeito reduzir a ingestão alimentar e aumentar a SPA. Em função do potencial da insulina na regulação da atividade locomotora, o objetivo desse trabalho é verificar se existe correlação entre flexibilidade metabólica (indicador de sensibilidade a insulina) e SPA em camundongos durante o processo de envelhecimento. Nossa hipótese é que ocorra uma redução da SPA à medida que os camundongos envelhecem (do desmame até um ano de vida), e essa queda seria acompanhada temporariamente por uma diminuição da flexibilidade metabólica. Avaliações adicionais incluem teste de tolerância à glicose e à insulina, que serão feitos a cada 3 meses, e as concentrações sanguíneas de insulina, leptina e algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , TNF- α) e expressão cerebral da proteína c fos, que serão determinados ao final do experimento.

ANIMAIS: Serão utilizados:
20 Camundongo isogênico c57bl/6j, machos com 21 dias de idade

Procedência: CEDEME
Manutenção: Biotério de camundongos do Departamento de Biociências (registro CEUA/Unifesp n. 28)

VIGÊNCIA DO ESTUDO:
Início previsto para: 03/2014 com término previsto para: 03/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 13/02/2014, ANALISOU e APROVOU todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente à CEUA até a conclusão do protocolo.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. O. Medina Pestana'.

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo