

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILA CRISTINA IANONI MATIUSSO

**BLOQUEIO COLINÉRGICO DURANTE A LACTAÇÃO ATENUA
O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EM RATOS ADULTOS**

Maringá

2018

CAMILA CRISTINA IANONI MATIUSSO

**BLOQUEIO COLINÉRGICO DURANTE A LACTAÇÃO ATENUA
O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EM RATOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias

Coorientador: Dra. Ananda Malta

Maringá

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M433b Matusso, Camila Cristina Ianoni
Bloqueio colinérgico durante a lactação atenua o desenvolvimento da obesidade em ratos adultos / Camila Cristina Ianoni Matusso. -- Maringá, 2018. 41, [6] f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ananda Malta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Obesidade. 2. Lactação. 3. Hiperinsulinemia. 4. Dieta hiperlipídica. I. Mathias, Paulo Cezar de Freitas, orient. II. Malta, Ananda, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Celular. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 571.57

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

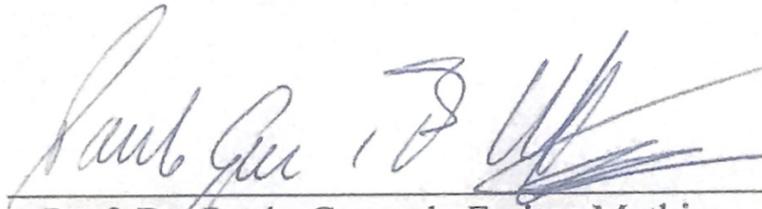
CAMILA CRISTINA IANONI MATIUSSO

**BLOQUEIO COLINÉRGICO DURANTE A LACTAÇÃO ATENUA O
DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EM RATOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas”.

Aprovado em: 27/02/2018

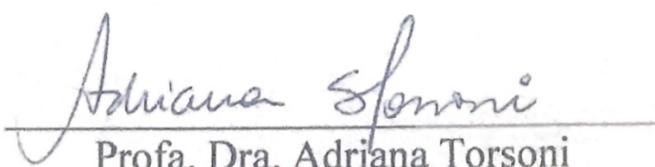
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias
Universidade Estadual de Maringá



Profa. Dra. Sabrina Grassioli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Profa. Dra. Adriana Torsoni
Unicamp – Câmpus de Limeira

Biografia

Camila Cristina Ianoni Matiusso nasceu em 21/07/1993 em Maringá/PR. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) (2015). Atualmente é mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá. Tem experiência na área de biologia celular e fisiologia, atuando principalmente nos seguintes temas: obesidade e secreção de insulina.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ter me capacitado a chegar até aqui.

Aos meus pais que são meu tudo e são sempre a luz no fim do meu túnel.

Ao meu irmão Eduardo, ao tio Eduardo, ao meu amor Eduardo e a minha irmã Mônica, por fazerem da minha caminhada nessa vida mais fácil.

Ao professor Paulo Cezar de Freitas Mathias meu orientador.

A Ananda Malta por ter me co-orientado e por toda ajuda.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, em especial aos meus amigos Lucas, Isabela, Ana Maria e Audrei.

Agradeço as agências de fomento, em especial a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Apresentação

Esta dissertação é composta de um artigo científico, intitulado **“Bloqueio colinérgico durante a lactação atenua o desenvolvimento da obesidade em ratos adultos”**. O trabalho demonstra o impacto de uma dieta rica em gordura na vida adulta de animais previamente programados por tratamento com um antagonista colinérgico. Em consonância com as regras do programa de pós-graduação em ciências biológicas, o artigo foi redigido de acordo com as normas da revista *Journal of Endocrinology*, com atual fator de impacto 4,7 (QUALIS CB1: A2).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO – A obesidade se tornou ao longo do tempo um problema mundial de saúde pública. Dentre as principais causas para essa doença cita-se: ingestão calórica em excesso, inatividade física e fatores genéticos e socioeconômicos. O conceito DOHaAD (Developmental Origins of Health and Disease) por meio de estudos clínicos e pré-clínicos sugerem uma forte associação entre agravos ambientais ocorridos na vida fetal ou nas fases iniciais da vida do indivíduo e o surgimento de doenças crônicas na vida adulta. O Sistema Nervoso Central é facilmente afetado em fases críticas do desenvolvimento, como na lactação. Em roedores, o pico de desenvolvimento dos órgãos e sistemas se dá nessa fase. A hiperinsulinemia no início da vida vem sendo associada a um fenótipo obeso na vida adulta, acompanhado de suas consequências metabólicas, de maneira contrária a hipoinsulinemia na fase perinatal está relacionada a um fenótipo magro na vida adulta. Nesses dois fenótipos, a atividade colinérgica parece ter um papel fundamental.

OBJETIVO - Investigar se o tratamento, a curto prazo durante a lactação, com uma droga antagonista colinérgica, o butilbrometo de escopolamina, poderá impedir o desenvolvimento da obesidade e suas consequências induzidas por dieta rica em gordura na vida adulta.

MÉTODOS - Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas com 70 dias de idade e machos com 80 dias de idade fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) foram colocados para cruzamento na proporção de três fêmeas para cada macho no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, onde foi realizado o acompanhamento dos animais. Constatada a prenhes, as fêmeas permaneceram em caixas individuais. Após o nascimento os filhotes foram divididos em 2 grupos experimentais ($n=8$ filhotes/ninhada): animais que receberam injeção intraperitoneal de solução butilbrometo de escopolamina na dose de 0,5 mg/Kg de peso corporal, o grupo tratado (T) e os animais do grupo controle (C) que receberam solução salina 0,9% no mesmo volume durante os 12 primeiros dias de vida. Aos 21 dias os filhotes foram

desmamados. Dos 60 aos 90 dias de idade, a prole recebeu dieta normolipídica (NL; 4.5% de gordura; Nuvital®; Curitiba/PR, Brazil) ou dieta hiperlipídica (HL; 35% de gordura). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos sob temperatura (23 ± 2.5 °C) e fotoperíodo (7:00 a.m. to 7:00 p.m., ciclo claro) controlados. Aos 91 dias, os animais passaram pelo teste de tolerância à glicose intravenoso. Após o teste, parte desses animais foram anestesiados e eutanasiados para o isolamento das ilhotas pancreáticas com o objetivo de estudar a secreção de insulina frente a diferentes concentrações de glicose, antagonistas e agonistas muscarínicos. Outro grupo de animais, aos 90 dias de vida, foi submetido ao registro elétrico dos nervos vago e esplâncnico e posterior retirada dos principais estoques de gorduras. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de test t de Student ou ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. O programa utilizado foi GraphPad Prism, versão 6.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Os animais controle que receberam a dieta hiperlipídica (HL) na vida adulta apresentaram elevado ganho de peso corporal, aumento nos estoques de gordura, elevada atividade parassimpática, alterações no metabolismo da glicose, no perfil lipídico e na secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas aos 90 dias. Curiosamente os animais T-HL apresentaram menores estoques de gordura, menor peso corporal, redução nos triglicérides e melhora do colesterol HDL e VLDL, sensibilidade à insulina, menor secreção de insulina e menor atividade parassimpática na vida adulta em relação ao grupo C-HL. Esses resultados sugerem que os animais tratados com antagonista muscarínico no início da vida apresentam um mecanismo de proteção ao desenvolvimento de obesidade e disfunções metabólicas na vida adulta, que pode estar associado a menor atividade nervo vago.

CONCLUSÃO – O tratamento com butilbrometo de escopolamina durante a lactação bloqueia o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica na vida adulta.

PALAVRAS-CHAVE - Lactação. Hipoinsulinemia. Obesidade

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – Obesity has been spread worldwide and it causing big trouble to public health, including Brazil. However, new insights using clinical and experimental data show that environmental insults, such us poor nutrition during early life, pregnancy, infancy and adolescence highly increase risk to cardiometabolic diseases: hypertension, obesity and type 2 diabetes in later life. Those observation and many others support DOHaD concept. The Central Nervous System is easily affected in critical fazes areas of development, such as lactation. In rodents, the peak of development of organs and systems occurs during lactation rather than in pregnancy. Hyperinsulinemia in early life has been associated with an obese phenotype in adult life, accompanied by its metabolic consequences. In other way hypoinsulinemia in the perinatal phase is related to a thin phenotype in adult life. Cholinergic terminals activity into pancreatic beta-cell has been associated to those phenotype-early insulin levels.

AIM - To investigate whether treatment, a short term during lactation, with a cholinergic antagonist drug, scopolamine butylbromide, prevent the development of high-fat-diet-induced obesity in adult life.

METHODS - Wistar (*Rattus norvegicus*) female rats with 70 days of age and males with 80 days of age provided by the Animal facilities of the State University of Maringá (UEM). Rats were mated in a harem model (three female to each male) housed during all protocol into animal facilities of laboratory of. Since was detected pregnancy females were placed in individual cages. After the birth of the pups were divided into 2 experimental groups (n = 8 pups / litter): animals received intraperitoneal injection of scopolamine butylbromide solution, 0.5 mg / kg body weight, the treated group (T) and control group (C) who received 0.9% saline solution in the same volume during the first 12 days of life. At 21 days the pups were weaned. From 60 to 90 days of age, rats were fed with normolipid diet (NL, 4.5% fat, Nuvital®, Curitiba / PR, Brazil) or a hyperlipid diet (HL, 35% fat). During the experimental period, animals were kept under controlled temperature (23 ± 25 °C) and

photoperiod (7:00 a.m. to 7:00 p.m., light cycle). At 91 days, the animals passed the intravenous glucose tolerance test. After the test, some of the animals were anesthetized and euthanized for the isolation of the pancreatic islets to study the secretion of insulin stimulate by glucose, and muscarinic agonists. Another group of animals, at 90 days of age, was submitted to electrical recording of the vagus and splanchnic nerves. Some fat pad were also removed to infer general fat deposition. Data were expressed as mean \pm standard error of the media and analyzed by Student's test or Tukey test two-way ANOVA with a 95% confidence interval. GraphPad Prism, version 6.01 was used to treat data.

RESULTS AND DISCUSSION - Control adult animals that received a hyperlipidemic diet (HL) in adult life presented high body weight gain, increased fat stores, impaired glucose homeostasis and insulin secretion by pancreatic islets; and high parasympathetic activity. Interestingly, T-HL animals presented lower fat tissue accumulation, lower body weight, high insulin sensitivity, lower insulin secretion, and lower parasympathetic activity compared to the C-HL group. These results suggest that animals treated with muscarinic antagonist early in life, showed an attenuation to high-fat-diet-induced obesity. Current study also suggest a possible new target, early muscarinic transduction signal intervention to mitigate or even avoid later metabolic diseases.

CONCLUSION - Treatment with scopolamine butylbromide during lactation block of the development of obesity by hyperlipidic diet in adult life.

KEYWORDS: Lactation. Hypoinsulinemia. Obesity

1 **BLOQUEIO COLINÉRGICO DURANTE A LACTAÇÃO ATENUA O**
2 **DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EM RATOS ADULTOS**

3

4

5 Camila Cristina Ianoni Matusso¹ Isabela Peixoto Martins¹; Audrei Pavanello¹; Ana Maria
6 Praxedes de Moraes¹; Carina Previante¹; Laize Peron Tófolo¹; Tatiane Aparecida Ribeiro¹;
7 Claudinéia Conationi da Silva Franco¹; Kelly Valério Prates¹; Paulo Cezar de Freitas
8 Mathias¹; Ananda Malta¹

9

10 ¹Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Departamento de Biotecnologia, Genética e
11 Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá – Maringá/PR, Brasil.

12

13 **Correspondência para:** Camila Cristina Ianoni Matusso; Departamento de Biotecnologia,
14 Genética e Biologia Celular; Laboratório de Biologia Celular da Secreção – Bloco H67,
15 sala 19, Universidade Estadual de Maringá/UEM - Fone/Fax + 55 (44) 3011 4892.
16 Colombo Avenida 5790, 87020-900, Maringá/PR – Brasil. Endereço de e-mail:
17 cah.matusso@gmail.com

18

19 **Palavras-chave:** Programação metabólica. Lactação. Hipoinsulinemia. Obesidade

20

21 **Resumo**

22 A hipoinsulinemia no início da vida vem sendo associado a um fenótipo magro na
23 vida adulta. Estudos anteriores sugerem que o uso de bloqueadores muscarínicos reduz a
24 insulinemia plasmática. Testamos se a administração de um antagonista muscarínico, o
25 butilbrometo de escopolamina, durante a lactação pode atenuar os efeitos de uma dieta
26 hiperlipídica (HL) na vida adulta. Para isso, ratos Wistar machos foram tratados durante os
27 12 primeiros dias de vida com uma, injeção intraperitoneal de butilbrometo de
28 escopolamina, grupo tratado (T) na dose 0,5mg/kg ou salina 0,9% grupo controle (C) no
29 mesmo volume. Após o desmame, os animais receberam dieta comercial até os 60 dias de
30 vida. Dos 60 aos 90 dias uma parte dos animais do grupo C e T receberam dieta
31 hiperlipídica (HL, 35% de gordura) e ou dieta normolipídica (NL, 4,5% de gordura). Aos
32 91 dias os procedimentos experimentais foram realizados. Animais C-HL apresentaram
33 obesidade, intolerância à glicose, resistência à insulina, maior secreção de insulina em
34 ilhotas pancreáticas e elevada atividade do sistema nervoso parassimpático. Curiosamente,
35 o grupo tratado (T) que recebeu dieta HL apresentou menor peso corporal, menores
36 estoques de gordura, menor atividade do nervo vago, hipoinsulinemia, melhor sensibilidade
37 à insulina. Concluímos que o tratamento com antagonista colinérgico durante os primeiros
38 12 dias de vida, provocou resistência ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta
39 hiperlipídica na vida adulta.

40

41 **Palavras-chave:** Programação metabólica. Lactação. Hipoinsulinemia. Obesidade

42

43 **1. Introdução**

44 De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade pode ser
45 conceituada como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo que pode
46 levar a um comprometimento da saúde. No último levantamento oficial feito pelo IBGE em
47 2009, 50% da população brasileira adulta está acima do peso, e crianças são em torno de
48 15%. Segundo Barbieri (2012) de uma forma geral, a obesidade é apontada como resultante
49 de um conjunto de fatores que na maioria dos casos atuam de forma combinada (Felisbino-
50 Mendes, et al. 2015; Seidell and Halberstadt 2015).

51 Estudos epidemiológicos e experimentais relacionam a influência de determinados
52 fatores ambientais do início da vida com alterações na expressão da carga genética do
53 indivíduo, determinando um padrão de saúde-doença peculiar. Igualmente, estudos clínicos
54 e pré-clínicos apontam para a mesma direção, sugerindo uma forte associação entre agravos
55 ambientais ocorridos na vida fetal ou nas fases iniciais da vida do indivíduo e o surgimento
56 de doenças crônicas na vida adulta. Essas observações apoiam a Teoria de David Barker
57 sobre *programação metabólica* e também o conceito DOHaD - Developmental origins of
58 health and disease (Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença) – dela originado
59 (Hales and Barker 1992; Silveira, et al. 2007).

60 O termo “programação metabólica” refere-se ao conceito no qual um insulto como a
61 má alimentação materna e tratamentos que interrompem o estado fisiológico ou estímulo
62 aplicado em um período crítico ou sensível pode ter efeitos duradouros ou persistentes
63 sobre a estrutura ou função de um organismo (Charmandari, et al. 2005). Uma vez que a
64 vida pré-natal, a infância e a adolescência são períodos críticos caracterizados por alta
65 plasticidade, a exposição a um insulto pode ter consequências de ordem organizacional e

66 produzir alterações persistentes no funcionamento do organismo (Crews, et al. 2007;
67 Khazipov and Luhmann 2006).

68 Vários hormônios atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) regulando seu
69 desenvolvimento e atividade. Dentre eles, insulina, leptina, grelina, testosterona e estrógeno
70 (Toran-Allerand, et al. 1988), entre outros. A insulina, um hormônio pancreático, está
71 diretamente relacionada as vias hipotalâmicas envolvidas na regulação da ingestão
72 alimentar e no gasto energético, além de atuar como um fator neurotrófico durante o
73 desenvolvimento do cérebro. Ainda, recentes estudos fornecem evidências para um
74 importante papel da insulina em vários processos celulares que inclui regulação da
75 transcrição e tradução gênica, proliferação e sobrevivência de células beta pancreáticas
76 (Leibiger, et al. 1998; Leroy, et al. 1996).

77 Além da glicose, a secreção de insulina é estimulada por vários hormônios e
78 neurotransmissores, dentre os quais a acetilcolina (ACh) desempenha um papel
79 proeminente. A ACh é liberada durante as fases pré e pós absorptivas da alimentação pelas
80 terminações parassimpáticas (nervo Vago) do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) que
81 inervam o pâncreas. O efeito da ACh na secreção da insulina é mediado pela ativação de
82 receptores muscarínicos constituídos por quatro subtipos: M1, M2, M3 e M4. A ação
83 insulínica é exercida pela ligação da ACh principalmente com o receptor muscarínico
84 do subtipo M1 e M3, localizado na membrana das células beta pancreáticas; (Gautam, et
85 al. 2006). O uso de agonista do M3, oxotremorina, potencializa a secreção de insulina
86 estimulada pela glicose; enquanto que antagonistas 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina do
87 M3 inibem a resposta colinérgica em ilhotas pancreáticas. Enquanto isso, os subtipos M2 e

88 M4 reduz o efeito insulíntrópico dos sutipos ímpares. (Henquin and Nenquin 1988;
89 Iismaa, et al. 2000).

90 Desequilíbrios, incluindo alta atividade do sistema nervoso parassimpático (SNP) e
91 baixa atividade do sistema nervoso simpático (SNS), são frequentemente observados em
92 humanos e roedores sobrepesados ou obesos (Spencer 2012; Tofolo, et al. 2015). Este
93 desequilíbrio associado as concentrações elevadas de insulina durante períodos críticos de
94 desenvolvimento como a lactação podem levar à programação das redes hipotalâmicas que
95 regulam o peso corporal e o metabolismo causando disfunções.

96 O SNC é facilmente afetado nas fases críticas do desenvolvimento, como na
97 lactação, pois a formação encefálica ainda continua nesta fase, com formação de sinapses,
98 tropismo de células neuronais, apoptose e crescimento axonal (Bouret 2009). O pâncreas de
99 roedores sofre modificações no período gestacional e lactacional. Particularmente, o
100 número e o tamanho de suas células, repercutindo sobre o controle da secreção de insulina
101 (Davidowa, et al. 2002)

102 Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a hiperinsulinemia no início
103 da vida, induzida por diabetes e obesidade gestacional ou superalimentação neonatal,
104 parece representar um importante fator de risco para o desenvolvimento de persistente
105 hiperinsulinemia (Dorner and Plagemann 1994). A hiperinsulinemia persistente tem sido
106 demonstrada como um importante fator de risco não somente para a diabetes, mas também
107 para aterosclerose e doenças cardiometabólicas (Aynsley-Green, et al. 1997).

108 Curiosamente diferentes modelos animais expostos a hipoinsulinemia no início da
109 vida, apresentam um fenótipo magro na vida adulta. Animais que passaram por restrição
110 proteica no início da vida e secretam menos insulina, menor peso corporal, sensibilidade a

111 insulina, melhor tolerância a glicose e baixa atividade parassimpática na vida adulta (de
112 Oliveira, et al. 2012). Camundongos adultos deficientes em receptores muscarínicos do
113 subtipo M3 apresentam uma diminuição significativa na ingestão alimentar, peso corporal e
114 estoques de gordura (Yamada, et al. 2001). Ainda, em um recente trabalho publicado pelo
115 nosso grupo mostrou que o tratamento com um bloqueador muscarínico durante a lactação
116 impediu a instalação da obesidade e hiperinsulinemia em ratos submetidos a
117 superalimentação neonatal (Malta, et al. 2016).

118 Diante disso, hipotetizamos que o uso de um bloqueador muscarínico no início da
119 vida poderá impedir a instalação da obesidade na vida adulta induzida por dieta
120 hiperlipídica. Para testar essa hipótese, utilizamos um antagonista colinérgico o
121 butilbrometo de escopolamina. Este composto é um alcaloide popularmente comercializado
122 como Buscopan, que se liga com alta afinidade aos receptores muscarínicos, localizados
123 nas células musculares lisas da área abdominal e pélvica, bem como nos gânglios dos
124 órgãos abdominais e pâncreas bloqueando a ação da ACh por competição. Sendo um
125 derivado de amônia quartenária com uma baixa lipossolubilidade, o butilbrometo de
126 escopolamina não atravessa a barreira hematoencefálica, estando assim, isento de efeitos
127 colaterais sobre o sistema nervoso central (Tytgat 2007).

128 Dessa forma, o objetivo do trabalho foi investigar se o tratamento, a curto prazo
129 durante a lactação, com uma droga antagonista colinérgica, o butilbrometo de
130 escopolamina, poderá impedir o desenvolvimento da obesidade e suas consequências
131 induzidas por dieta rica em gordura na vida adulta.

132

133 2. Materiais e métodos

134 2.1 Animais e condições experimentais

135 Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas com 70 dias de idade ($n=18$) e machos
136 com 80 dias ($n=6$) de idade fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de
137 Maringá (UEM) foram postos para cruzamento na proporção de três fêmeas para cada
138 macho no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, onde foi
139 realizado o acompanhamento dos animais. Constatada a prenhes através do esfregaço
140 vaginal e a presença de espermatozóide, as fêmeas permaneceram em caixas individuais.
141 Após o nascimento os filhotes foram divididos em 2 grupos experimentais ($n=8$
142 filhotes/ninhada): animais que receberam injeção intraperitoneal de solução butilbrometo
143 de escopolamina na dose de 0,5 mg/Kg de peso corporal (Malta et al. 2016), o grupo
144 tratado (T) e os animais do grupo controle (C) que receberam solução salina 0,9% no
145 mesmovolume durante os 12 primeiros dias de vida. Os filhotes permaneceram com as
146 mães até os 21 dias de vida para então serem desmamados. Foi padronizado o número de 4
147 ratos machos por caixa de polipropileno (45 cm / 30 cm / 15 cm) para todos os grupos, a
148 fim de garantir as mesmas condições de acesso à comida e água. Os ratos foram mantidos
149 sob condições controladas de luz (12 horas claro/12 horas escuro, com mudança de ciclo às
150 7h e 19h), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), água e ração à vontade.

151 Dos 60 aos 90 dias de idade metade dos animais de cada grupo recebeu uma dieta
152 hiperlipídica (5,8 kcal/g, 35% de banha de porco) ou normolipídica (3,8 kcal/g (Nuvital®,
153 Curitiba/PR, Brasil). A dieta hiperlipídica foi produzida como previamente descrito por
154 Barella e colaboradores (Barella, et al. 2012). O que resultou nos seguintes grupos
155 experimentais:

156 (1) Grupo controle que recebeu dieta normolípídica (**C-NL**);

157 (2) Grupo controle que recebeu dieta hiperlipídica (**C-HL**);

158 (3) Grupo tratado que recebeu dieta normolípídica (**T-NL**);

159 (4) Grupo tratado que recebeu dieta hiperlipídica (**T-HL**);

160 Aos 91 dias de vida foram realizados os procedimentos experimentais. Todos os
161 procedimentos seguiram as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
162 Universidade Estadual de Maringá.

163 As misturas de sais minerais e vitaminas utilizadas na confecção da dieta seguem as
164 recomendações do *American Institut of Nutrition*. A dieta normolípídica consiste na dieta
165 comercial para ratos (Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) (Tabela 1).

166

167 *2.2 Avaliação do peso corporal, ingestão alimentar*

168 A evolução do peso corporal (PC) e a ingestão alimentar foram registrados a cada
169 dois dias durante todo o período experimental (de Oliveira, et al. 2011) e apresentada
170 semanalmente. Ao final dos procedimentos experimentais, os ratos foram eutanasiados e os
171 estoques de gordura retroperitoneal e mesentérica foram removidos e pesados. Cada
172 estoque de gordura avaliado foi correlacionado com o PC de cada rato e calculado com
173 g/100g PC.

174

175 *2.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos*

176 Após 12 horas de jejum, amostras de sangue foram coletadas para avaliarmos os
177 valores plasmáticos de glicose e insulina aos 91 dias de vida. Sob anestesia, os animais
178 foram decapitados.

179 2.4 *Teste de tolerância à glicose intravenosa (TTGiv)*

180 Aos 91 dias de idade, um grupo de animais foi pesado e anestesiado com uma
181 mistura de Cetamina/Xilazina 75mg + 15mg/kg de peso corporal via intramuscular. Em
182 seguida foram submetidos à cirurgia para o implante de uma cânula de silicone na veia
183 jugular externa direita. Através de uma incisão na região cervical anterior, proceder-se-á a
184 dissecação dos tecidos até a visualização da veia, em seguida, a cânula de silicone foi
185 inserida dentro da veia, com o auxílio de uma agulha adaptada. A cânula foi fixada ao
186 músculo peitoral maior através de uma sutura simples com fio de algodão. A cânula foi
187 preenchida com solução de heparina a 10% (Liquemine[®]) diluída em salina (0,9% de
188 NaCl) para evitar a entrada de sangue na cânula e a conseqüente formação de coágulos no
189 seu interior. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram no biotério em
190 caixas individuais e ficaram em jejum por 12 horas antes da realização do *TTGiv* que
191 ocorreu 24 horas após os procedimentos cirúrgicos. Antes do início do *TTGiv* os animais
192 foram pesados para se estabelecer a dose de glicose a ser administrada. Para iniciar o *TTGiv*
193 foi feita uma primeira retirada de sangue (400µL) pela cânula que corresponde ao tempo
194 zero. Em seguida infundir-se-á uma solução de glicose na dose de 1g/kg de PC. Após a
195 administração da solução de glicose foram retiradas amostras de sangue (400µL) nos
196 tempos 5, 15, 30 e 45 minutos. Após cada retirada de sangue a cânula foi preenchida com
197 solução de heparina.

198

199 2.5 *Análise dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios.*

200 A glicose plasmática será dosada através do método enzimático-colorimétrico
201 (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil). O reagente de cor foi adicionado às amostras de
202 plasma e incubado por 10 min a 37°C em banho-maria para determinação da glicose
203 plasmática (BERGMEYER, 1974). As leituras de absorvância das amostras foram feitas em
204 espectrofotômetro (Analisador bioquímico semi-automático, BIO 200FL, Bio Plus®, São
205 Paulo/SP, Brasil). Para a determinação da insulinemia durante o *TTGiv* foi utilizado o
206 método de radioimunoensaio (RIA) (TRINDER, 1969).

207 Amostras sanguíneas em estado de jejum referente ao tempo zero do teste de *TTGiv*
208 foram coletadas para posteriores dosagens dos níveis plasmáticos, de glicemia e
209 insulinemia através dos métodos enzimáticos-colorimétricos, radioimunoensaio (RIA) e
210 respectivamente.

211 Níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides, lipoproteínas de alta densidade
212 (HDL-c), lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e lipoproteínas de muito baixa
213 densidade (VLDL-c) foram avaliados através de kit comercial para testes laboratoriais
214 Linha BIOLiquid® (SIMOES, MARQUES et al. 2007).

215 Os valores de LDL-c e VLDL-c foram calculados por meio do cálculo de
216 Friedewald:

217 $LDL-c \text{ (mg/dL)} = \text{Colesterol total} + (\text{Triglicérides} / 5) - HDL-c$

218 $VLDL-c \text{ (mg/dL)} = \text{Triglicérides} / 5.$

219

220 2.6 *HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment)*

221 Os níveis de glicose e insulina em jejum foram utilizados para calcular a avaliação
222 da resistência à insulina pelo modelo de homeostasia (HOMA-IR) usando a seguinte
223 equação: [HOMA-IR = glicemia de jejum (mg / dL) × insulina em jejum (ng / L) /22,5].

224

225 2.7 *Secreção de insulina*

226 Um outro grupo de animais foram utilizados para avaliarmos a secreção de insulina
227 em ilhotas pancreáticas. Para a retirada do pâncreas, os animais foram decapitados (De
228 Oliveira, et al. 2013). Feito isso, as ilhotas foram isoladas pelo método da colagenase,
229 adotando-se uma metodologia previamente descrita (Fritschy, et al. 1992). Para avaliarmos
230 a função dos receptores muscarínicos, outro lote de 4 ilhotas/poço, de ambos os grupos
231 experimentais, foi incubado por 60 min em solução Krebs-Ringer contendo glicose 8,3
232 mmol/L e/ou glicose 8,3 mmol/L mais acetilcolina 10 µmol/L (ACh) e neostigmina (10
233 µmol/L). Além disso o antagonista muscarínico não seletivo Atropina 10 µmol/L (Atr) foi
234 utilizado a fim de bloquear a ação da ACh. Para a ação bloqueadora seletiva dos receptores
235 muscarínicos do subtipo M2 e M3, as ilhotas também foram incubadas com metroctamina 1
236 µmol/L (MTT) e 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina 100 µmol / L (4-damp),
237 respectivamente. Ao final da incubação o sobrenadante foi recolhido para a dosagem da
238 insulina pelo método RIA.

239

240 *2.8 Atividade elétrica dos nervos Vago e Simpático*

241 Aos 91 dias de idade, um outro grupo de animais foram utilizados para a realização
242 do registro da atividade eletrofisiológica do ramo superior cervical do nervo vago e
243 simpático na região esplâncnica, Para isso os ratos foram anestesiados intraperitonealmente
244 com Tiopental (50 mg/ kg de MC) e imediatamente submetidos a procedimentos cirúrgicos
245 para fazer uma pequena incisão na região ventrocervical e dissecação dos tecidos e
246 músculos que recobrem a traqueia, com o uso de tesouras e pinças oftalmológicas. Em
247 seguida com o auxílio de cotonetes os tecidos adjacentes à artéria carótida foram dissecados
248 até que o ramo superior do nervo vago seja visto paralelamente a artéria carótida. Após a
249 visualização do nervo os procedimentos foram realizados com auxílio de uma lupa
250 estereoscópica. O nervo foi totalmente isolado dos tecidos circundantes e então sobreposto
251 em um par de eletrodos de prata no interior de uma gaiola metálica (Gaiola de Faraday).
252 Conectado a um sistema de amplificação e filtragem de sinais elétricos de alta impedância
253 (Bio-Amplificator, Insight®), com capacidade de captação de frequências de sinais em um
254 espectro de (1 a 80kHz), modificado de (Leon-Quinto, et al. 1998) a atividade elétrica foi
255 contabilizada pela taxa de despolarização e repolarização do nervo, e armazenada em HD
256 através de um Software (Monitor Bio-Amplificator, Insight®, Ribeirão Preto/ SP, Brasil)
257 que a registrou graficamente. A contagem do número de despolarizações no intervalo de
258 cinco segundos foi aleatoriamente padronizada para contabilizar apenas os picos que
259 ultrapassarem a linha do zero milivoltes (0mV) nos registros gráficos armazenados pelo
260 Software Monitor Bio-Amplificator, Insight®. O isolamento e registro do ramo simpático,
261 região na esplâncnica seguiu a mesma metodologia descrita acima para o nervo vago.

262 *2.9 Análise Estatística dos Dados*

263 Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e
264 submetidos ao teste de normalidade D' Agostino Person. Os dados foram submetidos a
265 análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido de pós teste de Tukey ou teste t-
266 Student quando necessário. $P < 0.05$ foi considerado significativo considerando os fatores
267 tratamento com antagonista colinérgico, Buscopan, (B); dieta (D) e interação (I) entre os
268 fatores B e D e para as diferenças entre os grupos. Os testes foram realizados através do
269 programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

270

271 3. Resultados

272

273 3.1 Parâmetros bioquímicos

274 De acordo com a tabela 2, o grupo T-NL não apresentou diferença significativa na
275 glicemia em jejum quando comparado C-NL. O consumo de dieta hiperlipídica aumentou
276 em 32% ($P < 0,05$) a glicemia em jejum do grupo controle quando comparado ao grupo C-
277 NL. Enquanto que não houve diferença significativa na glicemia de jejum entre T-NL e T-
278 HL, os animais T-HL apresentou uma glicemia de 23% menor que o grupo C-HL ($P < 0,05$).
279 Em relação à insulinemia de jejum, os animais C-HL são hiperinsulinêmicos em relação ao
280 grupo C-NL (92%, $P < 0,01$). O grupo T-NL apresenta menor insulinemia em relação ao C-
281 NL (81% $P < 0,01$). E o tratamento com buscopan reduziu em 60% ($P < 0,001$) a insulinemia
282 dos animais T-HL, em relação aos animais C-HL. O grupo C-HL apresentou um aumento
283 no índice HOMA-IR de 150% em relação ao C-NL ($P < 0,01$). Enquanto que o grupo T-NL
284 apresentou uma redução no índice em 80% comparado ao grupo C-NL indicando um efeito
285 do tratamento com buscopan ($P_B < 0,0001$) e o grupo T-HL exibiu uma redução de 69% em
286 comparação ao grupo C-HL ($P < 0,0001$).

287 Em relação ao perfil lipídico, o consumo da dieta hiperlipídica aumentou em 54%
288 ($P_D < 0,001$) o colesterol total do grupo C-HL em relação ao seu controle C-NL. O grupo T-
289 NL não apresentou diferença significativa no colesterol total em relação ao C-NL, no
290 entanto o grupo T-HL apresentou maiores níveis de colesterol total comparado ao T-NL.
291 Não foram observadas diferenças entre os grupos T-HL e C-HL. Quanto aos triglicerídeos,
292 consumo da dieta rica em gordura aumentou esse parâmetro em 32% ($P < 0,05$) no grupo C-
293 HL em relação ao C-NL. Não houve diferença significativa entre os grupos T-NL

294 comparado ao C-NL. No entanto, o grupo T-HL apresentou uma redução nos triglicérides
295 de 20% comparado ao C-HL indicando uma interação dos fatores B vs D ($P_1 < 0.05$). Os
296 animais tratados com buscopan que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento de
297 52% ($P < 0,01$) no colesterol HDL em relação ao grupo C-HL. Não houve diferença
298 significativa neste parâmetro entre os grupos C-HL comparado ao C-NL assim como entre
299 os grupos T-NL comparado ao C-NL. Em relação ao colesterol LDL, não se observou
300 diferenças significativas entre os grupos. Quanto ao colesterol VLDL, a dieta hiperlipídica
301 aumentou em 28% esse parâmetro no grupo C-HL comparado ao C-NL ($P < 0.05$), enquanto
302 que não se observou diferença entre os grupos T-NL comparado ao C-NL e T-HL
303 comparado ao C-HL.

304

305 *3.2 Evolução do peso corporal e consumo alimentar*

306 O tratamento com butilbrometo de escopolamina reduziu em 11% ($p < 0,0001$) o
307 peso corporal do 0 aos 60 dias de vida (Figura 1-A), assim como a ingestão alimentar no
308 mesmo período em 5% ($p < 0,05$) como mostra a ASC (figura 1-B). Quanto a evolução do
309 peso corporal dos 60 aos 90 dias (figura 1-C) o grupo C-HL apresentou aumento de peso
310 corporal de 11% ($P < 0,01$) em relação ao seu controle C-NL. Enquanto que os grupos T-NL
311 e T-HL apresentaram uma diminuição de 9% e 14% ($P < 0,05$; $P < 0,0001$) em relação aos
312 grupos C-NL e C-HL respectivamente. A ingestão da dieta hiperlipídica nesse período
313 diminuiu o consumo alimentar tanto dos animais tratados, quanto dos controles em 37%
314 ($P < 0,001$ em ambos) comparados aos seus controles. Os grupos que consumiram a dieta
315 normolipídica não apresentaram diferença estatística entre eles (figura 1-D).

316

317 *3.3 Acúmulo de tecido adiposo branco*

318 A figura 3 A mostra que o consumo de dieta hiperlipídica provocou no grupo C-HL
319 um aumento de 48% e 66% nos estoques de gordura mesentérica e retroperitoneal
320 respectivamente comparado ao C-NL ($P<0,0001$). Enquanto isso, os animais tratados com
321 buscopan apresentam menores estoques de gordura. O grupo T-NL exibiu uma redução de
322 aproximadamente 30% nos estoques de gordura em relação ao grupo C-NL e os animais T-
323 HL apresentou uma redução de 19% e 16% nas gorduras mesentérica e retroperitoneal
324 comparado com o grupo C-HL ($P<0,01$).

325

326 *3.4 Concentração plasmática de glicose durante o TTGiv*

327 O grupo controle que ingeriu dieta hiperlipídica na vida adulta (C-HL) apresentou
328 aumento de 34% ($P<0,0001$) na glicemia plasmática durante o teste quando comparado ao
329 grupo C-NL, como observado na ASC. Foi observado um aumento de 17% ($P<0,01$) na
330 glicemia plasmática do grupo T-NL quando comparado ao seu controle C-NL. Entretanto, o
331 grupo tratado com buscopan que recebeu dieta rica em gordura na vida adulta (T-HL)
332 apresentou uma diminuição de 13% ($P<0,01$) na glicemia comparado ao grupo C-HL
333 (figura 4).

334

335 3.5 *Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas*

336 A figura 4 A apresenta o efeito insulínico de diferentes concentrações de
337 glicose (5.6, 8.3 e 16.7 mmol/L) em ilhotas pancreáticas isoladas. Observa-se aumento na
338 secreção de insulina dose-dependente em todos os grupos. No entanto, o grupo C-HL
339 apresentou aumento na secreção de insulina comparado ao grupo C-NL quando estimulado
340 por todas as concentrações de glicose ($P < 0,05$). O grupo T-NL apresentou maior secreção
341 de insulina nas concentrações 5.6 e 8.3 mmol/L comparado ao C-NL ($P < 0,05$) entretanto, o
342 grupo T-HL apresentou diminuição da secreção de insulina em todas as concentrações de
343 glicose comparado ao seu controle C-HL ($P < 0,01$), observando uma interação entre os
344 fatores tratamento com buscopan e dieta hiperlipídica ($P_{\text{interação}} < 0,05$)

345 A figura 4 (B) apresenta a porcentagem de secreção de insulina pelas ilhotas
346 pancreáticas na presença do agonista muscarínico acetilcolina (ACh). O grupo C-HL
347 apresentou um aumento na secreção de insulina quando estimulado por ACh comparado
348 grupo C-NL ($P < 0,0001$). Os animais do grupo T-NL apresentaram uma potencialização da
349 secreção de insulina semelhante ao grupo C-NL, enquanto o grupo T-HL uma menor ação
350 insulínica da ACh, em relação ao grupo C-HL ($P < 0,0001$).

351 O antagonista muscarínico Atr provocou um bloqueio na secreção de insulina de
352 38%, 25%, 27% e 39% nos grupos C-NL, C-HL, T-NL e T-HL respectivamente ($P < 0,01$).
353 (figura 4-C).

354 O antagonista muscarínico seletivo 4-DAMP provocou bloqueio de 38%, 75%,
355 60% e 22% na secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas do grupo C-NL, C-HL, T-NL e
356 T-HL respectivamente. (figura 4-D).

357 A figura 4 E apresenta a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas na presença
358 deo antagonista seletivo metroctamina (MTT). Enquanto o grupo controle apresentou
359 aproximadamente 100% de aumento na secreção de insulina, os grupos C-HL, T-NL e T-
360 HL apresentaram 26%, 8% e 14%.

361

362 *3.6 Atividade elétrica dos nervos Vago e Simpático*

363 A figura 5 apresenta a atividade elétrica dos nervos Parassimpático e Simpático. O
364 grupo C-HL apresentou um aumento de 73% ($P<0,01$) na atividade elétrica do nervo vago,
365 quando comparado ao grupo C-NL. O grupo T-NL não apresentou diferença significativa
366 comparado ao C-NL (Figura 5A). enquanto que o grupo tratado com buscopan que recebeu
367 dieta hiperlipídica na vida adulta apresentou a atividade elétrica do nervo vago diminuída
368 em 32% ($P<0,05$) em relação ao C-HL. Não houve diferença significativa na atividade do
369 nervo simpático entre os grupos, no entanto observa-se interação entre os efeitos tratamento
370 com buscopan e dieta ($P_{\text{interação}}<0,05$).

371

372 4. Discussão

373 Este trabalho mostra pela primeira vez que o tratamento com o butilbrometo de
374 escopolamina no início da lactação foi capaz de atenuar a obesidade na vida adulta e as
375 disfunções metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica.

376 Enquanto que a dieta rica em gordura na vida adulta causa obesidade e disfunções
377 metabólicas, como previamente descrito (Barella et al. 2012; Salimi, et al. 2016; Tofolo et
378 al. 2015), os animais que receberam o tratamento durante a lactação e submetidos a dieta
379 HL na vida adulta apresentaram reduzidos níveis de insulina, melhora no perfil lipídico,
380 menor peso corporal, menores estoques de gordura, sensibilidade à insulina, melhor
381 tolerância à glicose e baixa atividade parassimpática. Interessantemente, os animais T-NL
382 também apresentam menor peso corporal, menores estoques de gordura, hipoinsulinemia e
383 sensibilidade à insulina. Esses resultados podem sugerir um papel importante da atividade
384 colinérgica para o tratamento e prevenção da obesidade.

385 O sistema colinérgico central e periférico desempenham um papel importante no
386 metabolismo da glicose/insulina, acúmulo de gordura e ingestão alimentar (Kiba 2004). O
387 sistema nervoso autônomo (SNA) influencia em muitas funções do corpo, incluindo o
388 pâncreas. O sistema nervoso parassimpático (SNP) e o simpático (SNS) têm efeitos opostos
389 na secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas, o SNP estimula a secreção de insulina,
390 enquanto que a atividade neural simpática inibe a secreção de insulina (Kiba 2004). Estudos
391 vêm relacionando a alta atividade parassimpática e a hiperinsulinemia persistente à
392 obesidade e problemas metabólicos (Aynsley-Green et al. 1997). Em contrapartida, um
393 fenótipo magro, hipoinsulinemia parece estar associado a menor atividade vagal, como

394 observado em ratos que receberam uma dieta de restrição proteico calórica durante a
395 lactação (de Oliveira et al. 2012).

396 O grupo C-HL neste trabalho apresenta elevados níveis de insulina em jejum, maior
397 secreção de insulina, alta atividade parassimpática, perfil lipídico alterado, maior peso
398 corporal e estoques de gordura, como descreve a literatura (Higa, et al. 2014; Salimi et al.
399 2016). De forma oposta, os animais tratados com o butilbrometo de escopolamina
400 apresentam menor peso corporal e ingestão até os 60 dias de vida como já observado
401 (Malta et al. 2016). Já os animais tratados que foram expostos a dieta HL apresentam
402 menor peso corporal, menor deposição de gordura, melhora no perfil lipídico e menor
403 atividade vagal. Ainda, trabalhos anteriores apresentam que animais obesos vagotomizados
404 possuem menores estoques de tecido adiposo branco (Balbo, et al. 2007). Estes resultados
405 sugerem que os menores estoques de gorduras e melhora no perfil lipídico podem estar
406 relacionados a uma melhora na função pancreática relacionada a secreção de insulina e a
407 menor atividade do nervo vago.

408 A ação da atividade do SNP é mediada pela ACh (Kiba 2004). Este
409 neurotransmissor exerce suas funções ao se ligar em receptores de membrana do tipo
410 nicotínicos e muscarínicos. Os receptores Muscarínicos compreendem 5 subtipos (M1 ao
411 M5), e estão acoplados a diferentes tipos de proteína G e são encontradas nas membranas
412 celulares tanto central quanto periféricamente em vários órgãos (Gautam et al. 2006; Iismaa
413 et al. 2000; Wess, et al. 2007). Os receptores muscarínicos dos subtipos M1, M3 e M5
414 apresentam-se acoplados preferencialmente as proteínas das famílias Gq e G₁₁ e a ativação
415 induzida pelo agonista ACh leva a uma cascata de respostas bioquímicas e fisiológicas
416 como o aumento das concentrações de cálcio intracelular e produção de segundos

417 mensageiros como o diacilglicerol e inositol trifosfato. A natureza dessas respostas e os
418 efeitos fisiológicos resultante está associada a localização celular dos receptores. Já os
419 receptores muscarínicos dos subtipos M2 e M4 quando ativados pela ACh apresentam, de
420 modo geral, diminuição da ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes, menores
421 concentrações de adenilil ciclase e cAMP (Gautam et al. 2006; Wess et al. 2007). Nas
422 células beta pancreáticas esses receptores podem atuar potencializando (M1 e M3) a
423 secreção de insulina ou inibindo a potencialização (M2 e M4), através da acetilcolina
424 (Maresca and Supuran 2008).

425 A ingestão de uma dieta hiperlipídica causou nos animais controles disfunção na
426 secreção de insulina. Esses animais apresentam elevada secreção de insulina na presença de
427 diferentes concentrações de glicose, como também frente a agonistas e antagonistas
428 muscarínicos. Diante disso, sugerimos que esses animais possam apresentar maior
429 expressão dos receptores muscarínicos do subtipo M3 em ilhotas pancreáticas e reduzida
430 expressão do subtipo M2 devido maior resposta na secreção de insulina frente ao agonista
431 ACh e ao antagonista MTT como também observado em outros modelos de obesidade em
432 ratos, o qual suporta a ideia de que a composição e/ou função dos receptores muscarínicos
433 em ilhotas pancreáticas pode estar associada a disfunção na secreção de insulina em obesos
434 (Malta et al. 2016; Miranda, et al. 2014).

435 Já os animais T-HL apresentam menor secreção de insulina frente a diferentes
436 concentrações de glicose como também menor resposta de secreção frente ao agonista ACh
437 e antagonista 4-Damp quando comparados com os animais C-HL. No entanto, quando as
438 ilhotas foram incubadas com o antagonista geral Atr, observa-se um bloqueio eficaz da
439 secreção de insulina. Nossos resultados sugerem que as ilhotas pancreáticas do grupo T-HL

440 apresentam uma composição alterada de receptores muscarínicos. Tem sido mostrado que
441 a menor secreção de insulina em ilhotas pancreáticas e menor resposta de agentes agonistas
442 e antagonistas muscarínicos estão associados a menor expressão dos receptores
443 muscarínicos M3 e maior expressão dos receptores muscarínicos M2 (de Oliveira et al.
444 2011; Malta et al. 2016). Ainda, a melhor resposta a Atr pode indicar um importante papel
445 do receptor muscarínico do subtipo M1 na secreção de insulina (Miranda et al. 2014).
446 Dessa forma, sugerimos que o tratamento com o antagonista colinérgico butilbrometo de
447 escolpolamina no início da vida pode ter modulado a expressão e/ou função dos receptores
448 muscarínicos nas células beta pancreáticas o que pode refletir em a uma menor, porem
449 eficaz secreção de insulina frente a demanda calórica observado no grupo T-HL.

450 A insulina é um hormônio anabólico, regulador periférico chave da ingestão
451 alimentar e adiposidade corporal. Sendo também o principal regulador do metabolismo da
452 glicose (Leibiger et al. 1998). Os níveis de insulina plasmática se correlacionam
453 diretamente com peso corporal e com a adiposidade (Barazzoni, et al. 2018). Modelos
454 experimentais de roedores obesos e humanos apresentam elevados níveis de insulina basal e
455 secretam mais insulina em resposta à glicose do que em indivíduos magros. Ainda, a
456 intolerância à glicose associada à resistência à insulina observada contribui para maior
457 acúmulo de gordura nos casos de obesidade (Balbo et al. 2007; Franco, et al. 2017).
458 Hipoinsulinemia de jejum, menores estoques de gordura associado a menores níveis de
459 triglicérides, melhora no colesterol HDL, menor peso corporal associado a menor ingestão
460 alimentar, melhor tolerância à glicose e sensibilidade periférica a insulina como estimado
461 pelo índice HOMA-IR foi observado nos animais tratados com o antagonista muscarínico
462 durante a lactação após a oferta da dieta hiperlipídica comparado com animais não tratados.

463 A sensibilidade periférica à insulina observada nesses animais pode ser um fator
464 chave para a resistência ao desenvolvimento da obesidade. Por mecanismos não descritos,
465 foi observado aumento da sensibilidade à insulina em humanos obesos e magros que
466 receberam infusão aguda do antagonista muscarínico Atropina durante o teste clamp
467 euglicêmico hiperinsulinêmico (Svensson, et al. 2011). Em outras condições experimentais,
468 como restrição calórica durante a lactação em ratos, também tem associado o aumento na
469 sensibilidade à insulina com a resistência ao desenvolvimento da obesidade induzida por
470 uma dieta hipercalórica (Palou, et al. 2011).

471 Em diversas espécies animais, as influências ambientais podem atingir o feto
472 através da mãe/placenta ou o neonato através da lactação, promovendo adaptações
473 fisiológicas que aumentam a chance do indivíduo sobreviver naquele meio, esse modelo se
474 encaixa no conceito DOHaD e foi chamado de respostas adaptativas preditivas (Gluckman
475 and Hanson 2004a). A resposta adaptativa preditiva sugere que o organismo em
476 desenvolvimento tem a capacidade de prever o ambiente no qual crescerá. Se a previsão for
477 correta, o risco para futuras doenças é baixo, do contrário há um aumento para esses riscos
478 (*match or mismatch*) (Gluckman and Hanson 2004b). Os resultados deste trabalho
479 reafirmam a importância do período lactacional para a formação do organismo. Seguindo o
480 modelo das respostas adaptativas preditivas, esperava-se que os animais tratados com
481 bloqueador muscarínico no início da lactação apresentassem na vida adulta graves
482 problemas metabólicos relacionados a obesidade frente a uma abundância calórica
483 (*mismatch*). Contudo, nossos resultados mostram que esses animais foram capazes de
484 atenuar a obesidade e os efeitos causados por uma dieta hipercalórica, propondo que o
485 organismo é capaz de sofrer modulações, mesmo quando as circunstâncias previstas no

486 início da vida são diferentes da encontrada na vida adulta. O conceito DOHaD tem nuances
487 que foram explorados pelo presente trabalho. Uma vez que a lactação como janela de
488 programação pode mostrar um efeito adverso frente a abundância calórica. Será que
489 conseguimos mostrar uma contestação ou reforço ao conceito DOHaD?

490 Por ser um composto polar e derivado da amônia quaternária o butilbrometo de
491 escopolamina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Tytgat 2007;
492 Wildiers, et al. 2009). Em mamíferos a BHE é funcional logo após o nascimento. Durante o
493 desenvolvimento pós-natal, os mecanismos da barreira são modulados dinamicamente para
494 fornecer um microambiente necessário para o cérebro em desenvolvimento. Nos roedores a
495 BHE é imatura no nascimento em comparação com outras espécies de mamíferos (Schmitt,
496 et al. 2017). Por isso, podemos considerar que o composto pode estar atravessando a
497 barreira e dessa forma causando efeitos sob a homeostase metabólica. É preciso considerar
498 ainda que o tratamento com o butilbrometo de escopolamina pode afetar outros tecidos, que
499 eventualmente poderiam contribuir para os efeitos observados, porém não foi investigado
500 nesse estudo.

501 Dessa forma concluímos que o tratamento com um antagonista colinérgico durante
502 a lactação, protege os animais do desenvolvimento da obesidade e suas disfunções
503 metabólicas na vida adulta, induzidas por dieta hiperlipídica. Estes efeitos podem estar
504 associados a modulação da função e/ou expressão dos receptores muscarínicos nas células
505 beta, a uma melhora na função pancreática, elevada sensibilidade à insulina e reduzida
506 atividade parassimpática. No entanto, devemos considerar que futuros estudos precisam ser
507 realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nessa proteção.

508

509 **CONFLITO DE INTERESSES**

510 Os autores declaram que não há conflitos de interesses que possam ser percebidos como
511 prejudicando a imparcialidade da pesquisa relatada.

512

513 **SUPORTE FINANCEIRO**

514 Este trabalho foi apoiado pela Fundação Federal do Brasil, o Conselho Nacional de
515 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento
516 de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

517

518 **AGRADECIMENTOS**

519 Agradeço as técnicas Maroly Pinto e a Marli Lícero pelo trabalho no biotério e com os
520 animais.

521

524 Aynsley-Green A, Hawdon JM, Deshpande S, Platt MW, Lindley K & Lucas A 1997
525 Neonatal insulin secretion: implications for the programming of metabolic homeostasis.

526 *Acta Paediatr Jpn* **39 Suppl 1** S21-25.

527 Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito Mdo N, Andreazzi
528 AE, Mathias PC & Torrezan R 2007 Fat storage is partially dependent on vagal activity and
529 insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* **31** 142-148.

530 Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M & Nisoli E 2018 Insulin resistance in obesity:
531 an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord*.

532 Barella LF, de Oliveira JC, Branco RC, Camargo RL, Gomes RM, Mendes FC, Miranda
533 RA, Gravena C, Torrezan R, Grassioli S, et al. 2012 Early exposure to a high-fat diet has
534 more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in
535 rats. *Horm Metab Res* **44** 458-464.

536 Bouret SG 2009 Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. *J Pediatr*
537 *Gastroenterol Nutr* **48 Suppl 1** S31-38.

538 Charmandari E, Tsigos C & Chrousos G 2005 Endocrinology of the stress response. *Annu*
539 *Rev Physiol* **67** 259-284.

540 Crews F, He J & Hodge C 2007 Adolescent cortical development: a critical period of
541 vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* **86** 189-199.

542 Davidowa H, Li Y & Plagemann A 2002 Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons
543 of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-
544 concentrating hormone. *Regul Pept* **108** 103-111.

545 de Oliveira JC, Grassioli S, Gravena C & de Mathias PC 2012 Early postnatal low-protein
546 nutrition, metabolic programming and the autonomic nervous system in adult life. *Nutr*
547 *Metab (Lond)* **9** 80.

548 De Oliveira JC, Ludemann Camargo R, Barella LF, Chaves Souto Branco R, Gravena C,
549 Grassioli S, Torrezan R & Cezar De Freitas Mathias P 2013 Anesthetic-induced transient
550 hyperglycemia and insulin resistance do not depend on the sympathoadrenal axis. *Minerva*
551 *Endocrinol* **38** 379-388.

552 de Oliveira JC, Scomparin DX, Andreazzi AE, Branco RC, Martins AG, Gravena C,
553 Grassioli S, Rinaldi W, Barbosa FB & Mathias PC 2011 Metabolic imprinting by maternal
554 protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. *J Neuroendocrinol* **23** 148-157.

555 Dorner G & Plagemann A 1994 Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor
556 for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab*
557 *Res* **26** 213-221.

558 Felisbino-Mendes MS, Moreira AD & Velasquez-Melendez G 2015 Association between
559 maternal nutritional extremes and offspring mortality: A population-based cross-sectional
560 study, Brazil, Demographic Health Survey 2006. *Midwifery* **31** 897-903.

561 Franco CCS, Prates KV, Previante C, Moraes AMP, Matusso CCI, Miranda RA, de Oliveira
562 JC, Tofolo LP, Martins IP, Barella LF, et al. 2017 Glibenclamide treatment blocks
563 metabolic dysfunctions and improves vagal activity in monosodium glutamate-obese male
564 rats. *Endocrine* **56** 346-356.

565 Fritschy WM, van Suylichem PT, Wolters GH & van Schilfgaarde R 1992 Comparison of
566 top and bottom loading of a dextran gradient for rat pancreatic islet purification. *Diabetes*
567 *Res* **19** 91-95.

568 Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, et al.
569 2006 A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating
570 insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab* **3** 449-461.

571 Gluckman PD & Hanson MA 2004a Developmental origins of disease paradigm: a
572 mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* **56** 311-317.

573 Gluckman PD & Hanson MA 2004b Living with the past: evolution, development, and
574 patterns of disease. *Science* **305** 1733-1736.

575 Hales CN & Barker DJ 1992 Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty
576 phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35** 595-601.

577 Henquin JC & Nenquin M 1988 The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-
578 cells. *FEBS Lett* **236** 89-92.

579 Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH & Evangelista FS 2014 Comparison between
580 cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol*
581 *Pathophysiol Pharmacol* **6** 47-54.

582 Iismaa TP, Kerr EA, Wilson JR, Carpenter L, Sims N & Biden TJ 2000 Quantitative and
583 functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines
584 and rat pancreatic islets. *Diabetes* **49** 392-398.

585 Khazipov R & Luhmann HJ 2006 Early patterns of electrical activity in the developing
586 cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* **29** 414-418.

587 Kiba T 2004 Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas
588 including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas* **29** e51-
589 58.

590 Leibiger IB, Leibiger B, Moede T & Berggren PO 1998 Exocytosis of insulin promotes
591 insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM
592 kinase pathways. *Mol Cell* **1** 933-938.

593 Leon-Quinto T, Magnan C & Portha B 1998 Altered activity of the autonomous nervous
594 system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy
595 restriction in the rat. *Endocrinology* **139** 3382-3389.

596 Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G & Dani C 1996
597 Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* **271** 2365-2368.

598 Malta A, Souza AA, Ribeiro TA, Francisco FA, Pavanello A, Prates KV, Tofolo LP,
599 Miranda RA, Oliveira JC, Martins IP, et al. 2016 Neonatal treatment with scopolamine
600 butylbromide prevents metabolic dysfunction in male rats. *Sci Rep* **6** 30745.

601 Maresca A & Supuran CT 2008 Muscarinic acetylcholine receptors as therapeutic targets
602 for obesity. *Expert Opin Ther Targets* **12** 1167-1175.

603 Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, Barella LF, Franco CC, Trombini AB, Malta
604 A, Gravena C, Torrezan R, Mathias PC, et al. 2014 Insulin oversecretion in MSG-obese
605 rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets.
606 *Cell Physiol Biochem* **33** 1075-1086.

607 Palou M, Torrens JM, Priego T, Sanchez J, Palou A & Pico C 2011 Moderate caloric
608 restriction in lactating rats programs their offspring for a better response to HF diet feeding
609 in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem* **22** 574-584.

610 Salimi M, Zardoos H, Khodaghali F, Rostamkhani F & Shaerzadeh F 2016 High-fat diet
611 with stress impaired islets' insulin secretion by reducing plasma estradiol and pancreatic
612 GLUT2 protein levels in rats' proestrus phase. *J Physiol Pharmacol* **67** 653-666.

613 Schmitt G, Parrott N, Prinssen E & Barrow P 2017 The great barrier belief: The blood-
614 brain barrier and considerations for juvenile toxicity studies. *Reprod Toxicol* **72** 129-135.

615 Seidell JC & Halberstadt J 2015 The global burden of obesity and the challenges of
616 prevention. *Ann Nutr Metab* **66 Suppl 2** 7-12.

617 Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ & Barbieri MA 2007 Developmental origins of
618 health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)* **83** 494-504.

619 Spencer SJ 2012 Early life programming of obesity: the impact of the perinatal
620 environment on the development of obesity and metabolic dysfunction in the offspring.
621 *Curr Diabetes Rev* **8** 55-68.

622 Svensson MK, Jansson PA, Persson AL, Sjostrand M & Eriksson JW 2011 Atropine
623 improves insulin sensitivity in both lean and abdominally obese subjects. *J Clin Endocrinol*
624 *Metab* **96** E1843-1847.

625 Tofolo LP, da Silva Ribeiro TA, Malta A, Miranda RA, Gomes RM, de Oliveira JC,
626 Abdennebi-Najar L, de Almeida DL, Trombini AB, da Silva Franco CC, et al. 2015 Short-
627 term moderate exercise provides long-lasting protective effects against metabolic
628 dysfunction in rats fed a high-fat diet. *Eur J Nutr* **54** 1353-1362.

629 Toran-Allerand CD, Ellis L & Pfenninger KH 1988 Estrogen and insulin synergism in
630 neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with
631 growth factors? *Brain Res* **469** 87-100.

632 Tytgat GN 2007 Hyoscine butylbromide: a review of its use in the treatment of abdominal
633 cramping and pain. *Drugs* **67** 1343-1357.

634 Wess J, Eglen RM & Gautam D 2007 Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice
635 provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **6** 721-733.

636 Wildiers H, Dhaenekint C, Demeulenaere P, Clement PM, Desmet M, Van Nuffelen R,
637 Gielen J, Van Droogenbroeck E, Geurs F, Lobelle JP, et al. 2009 Atropine, hyoscine
638 butylbromide, or scopolamine are equally effective for the treatment of death rattle in
639 terminal care. *J Pain Symptom Manage* **38** 124-133.

640 Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M,
641 Chou CJ, Xia B, Crawley JN, et al. 2001 Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine
642 receptor are hypophagic and lean. *Nature* **410** 207-212.

643

644 **LEGENDA DAS FIGURAS**

645

646 **Figura 1 – Evolução do peso corporal e ingestão alimentar.** Peso corporal do 0 aos 60
647 dias **(A)** e 60 aos 90 dias de vida **(C)** e ingestão alimentar dos 21 aos 60 dias **(B)** e 60 aos
648 90 dias de vida **(D)**. Valores expressos como média ± EPM de 20 a 25 ratos de 4 ninhadas
649 diferentes. O gráfico em barras em cada figura representa a área sob a curva (ASC).
650 *P<0,05 e ****P<0,0001 para diferença avaliada pelo teste t-Student. Dados foram
651 submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias considerando os fatores: (B)
652 Tratamento com Buscopan, (D) dieta e (I) interação entre os fatores B e D. ^ΩP<0,05, ^{ΩΩ}
653 ^ΩP<0,0001 para análise entre os grupos C vs T nas mesmas condições e ^{##}P<0,01,
654 ^{####}P<0,0001 para análise entre NL vs HL nas mesmas condições analisados pelo pós-teste
655 de Tukey. C: grupo controle, T: grupo tratado, NL: ração normolipídica, HL ração
656 hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

657

658 **Figura 2 – Acumulo de tecido adiposo branco.** Acumulo de gordura mesentérica **(A)** e
659 retroperitoneal **(B)**. Valores expressos como média ± EPM de 20 a 25 ratos de 4 ninhadas
660 diferentes. Dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias
661 considerando os fatores: (B) Tratamento com Buscopan, (D) dieta e (I) interação entre os
662 fatores B e D. ^{ΩΩ}P<0,01 para para análise entre os grupos C vs T nas mesmas condições e
663 ^{####}P<0,0001 para análise entre NL vs HL nas mesmas condições analisados pelo pós-teste
664 de Tukey. C: grupo controle, T: grupo tratado NL: ração normolipídica, HL ração
665 hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

666 **Figura 3 – Concentração plasmática de glicose durante o TTGiv.** Valores expressos
667 como média \pm EPM de 12 a 15 ratos de 3 ninhadas diferentes. O gráfico em barras
668 representa a área sob a curva (ASC). Dados foram submetidos à análise de variância
669 ANOVA de duas vias considerando os fatores: (B) Tratamento com Buscopan, (D) dieta e
670 (I) interação entre os fatores B e D. $\Omega\Omega\Omega P < 0,001$ para análise entre os grupos C vs T nas
671 mesmas condições e $#### P < 0,0001$ para análise entre NL vs HL nas mesmas condições
672 analisados pelo pós-teste de Tukey. C: grupo controle, T: grupo tratado, NL: ração
673 normolipídica, HL: ração hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

674

675 **Figura 4 – Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas.** Secreção de insulina
676 estimulado por diferentes concentrações de glicose (mmol/L): 5.6, 8.3 e 16.7 (A). Secreção
677 de insulina estimulada por 8,3 mmol/l de glicose e potencializada por 10 μ mol/l de ACh na
678 presença de 10 μ mol/L de neostigmina (B). Inibição ou estimulação do efeito
679 insulínico da ACh pelo antagonista muscarínico não seletivo Atr, 10 μ mol/L (C); pelo
680 antagonista muscarínico seletivo para o subtipo M3, 4-DAMP (100 μ mol/l) (D); pelo
681 antagonista muscarínico seletivo para o subtipo M2, MTT (1 μ mol/l) (E). As barras
682 representam a média \pm EPM da secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de 6 ratos de
683 três ninhadas diferentes. A linha 0 (B a E) representa 100% de secreção de insulina
684 induzida por 8,3 mmol/l de glicose e potencializada por 10 μ mol/l ACh; barras acima ou
685 abaixo da linha 0 representa o aumento ou diminuição da secreção de insulina na presença
686 de agonistas ou antagonistas muscarínicos. Dados foram submetidos à análise de variância
687 ANOVA de duas vias considerando os fatores: (B) Tratamento com Buscopan, (D) dieta e

688 (I) interação entre os fatores B e D. $^{\Omega}P<0,05$, $^{\Omega\Omega}P<0,01$ $^{\Omega\Omega\Omega}P<0,0001$ para análise entre
689 os grupos C vs T nas mesmas condições e $^{####}P<0,0001$ para análise entre NL vs HL nas
690 mesmas condições analisados pelo pós-teste de Tukey. C: grupo controle; T: grupo tratado,
691 NL: ração normolipídica, HL ração hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

692

693 **Figura 5 – Atividade elétrica dos nervos vago (A) e simpático (B).** Valores expressos
694 como média \pm EPM de 12 a 15 ratos de três ninhadas diferentes. Dados foram submetidos à
695 análise de variância ANOVA de duas vias considerando os fatores: (B) tratamento com
696 Buscopan, (D) dieta e (I) interação entre os fatores B e D. $^{\Omega}P<0,05$ para análise entre os
697 grupos C vs T nas mesmas condições e $^{##}P<0,01$ para análise entre NL vs HL nas mesmas
698 condições analisados pelo pós-teste de Tukey. C: grupo controle, T: grupo tratado, NL:
699 ração normolipídica, HL: ração hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

TABELA 2: Efeitos do tratamento com butilbrometo de escopolamina nos parâmetros bioquímicos de animais que receberam dieta hiperlipídica na vida adulta.

Parâmetros	Fatores						
	C-NL	C-HL	T-NL	T-HL	B	D	I
Glicemia em jejum (mg/dl)	84,3±3,6	111,4±11,2 [#]	84,5±2,9	85,5±3,1 ^Ω	*	*	*
Insulinemia em jejum (ng/ml)	0.27±0.01	0.52±0.07 ^{##}	0.05±0.01 ^{ΩΩ}	0.2±0.07 ^{ΩΩΩ}	****	***	ns
Índice HOMA IR	1,48±0,07	3,71±0,62 ^{##}	0,27±0,05	1,15±0,3 ^{ΩΩΩ}	****	***	ns
Colesterol total (mg/dl)	60,5±5,65	85,6±5,04 ^{###}	65,9±4,33	94,6±5,53 ^{###}	*	****	ns
Triglicerídeos (mg/dl)	62,7±5,56	82,5±2,69 [#]	80,5±7,46	73,3±6,59	ns	ns	*
Colesterol - HDL (mg/dl)	34,9±3,65	39,7±6,13	36,1±3,69	49,1±4,11 ^{ΩΩ}	***	ns	ns
Colesterol - LDL (mg/dl)	21,9±4,5	27,3±4,3	22,3±5,7	27,2±4,8	ns	ns	ns
Colesterol - VLDL (mg/dl)	13.1±1,05	16,5±0,56 [#]	16,1±1,49	14,68±1,31	ns	*	*

Valores expressos como média ± EPM. de 20 a 30 ratos de pelo menos 3 ninhadas diferentes. Dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias considerando *P<0,05, ***P<0,001 e ****P<0,0001 para análise dos fatores: (B) Tratamento com Buscopan, (D) dieta e (I) interação entre os fatores B e D. ^Ω P<0,05, ^{ΩΩ} P<0,01 e ^{ΩΩΩ} P<0,001 para análise entre C vs T nas mesmas condições e [#]P<0,05, ^{##}P<0,01, ^{###}P<0,001 para análise entre NL vs HL nas mesmas condições analisados pelo pós-teste de Tukey. C: grupo controle, T: grupo tratado, NL: ração normolipídica, HL: ração hiperlipídica. ns: resultado não significativo.

FIGURA 2

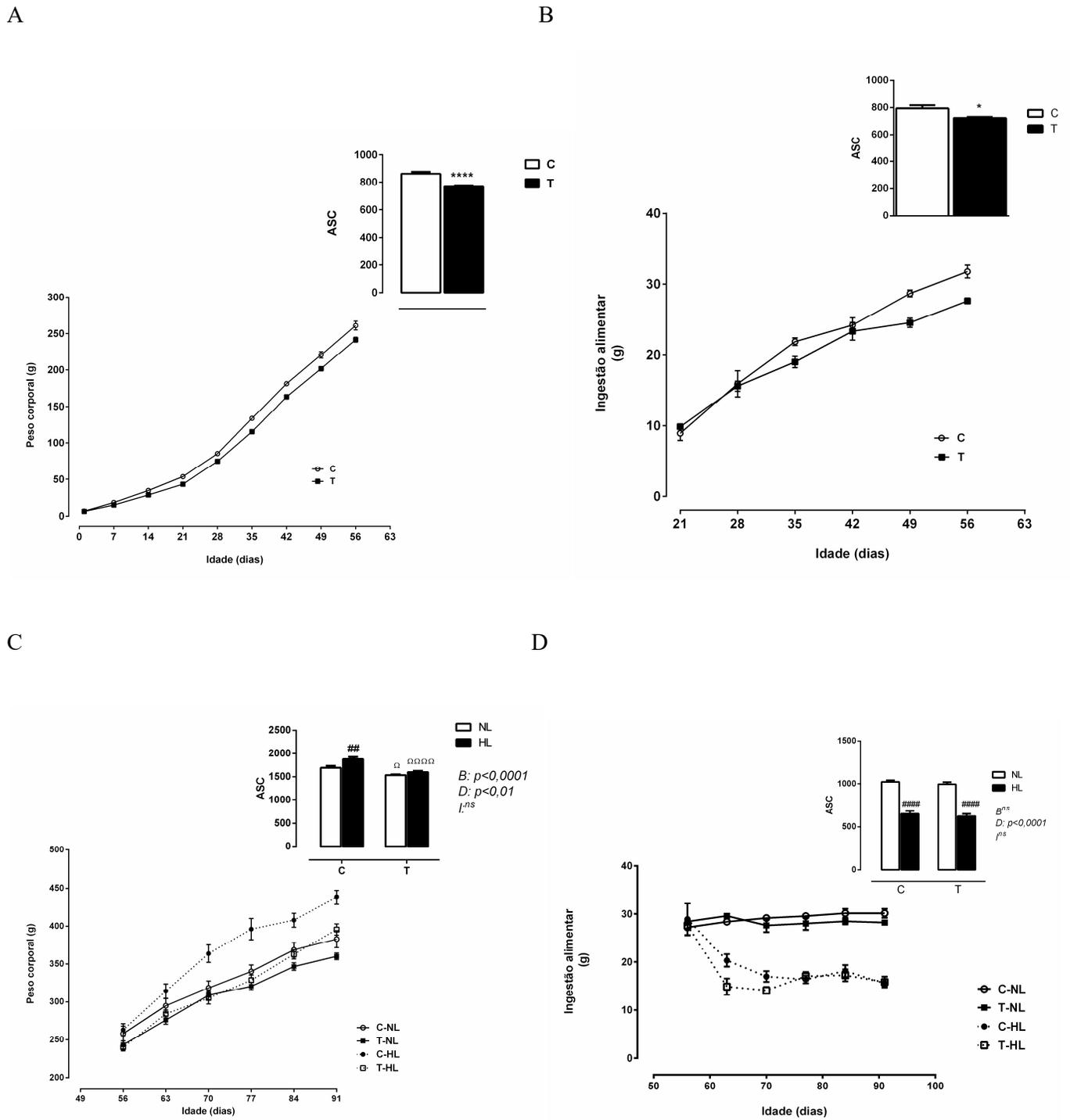
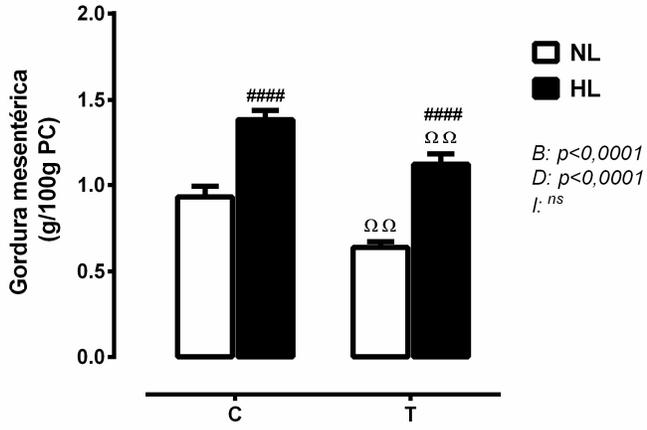


FIGURA 3

A



B

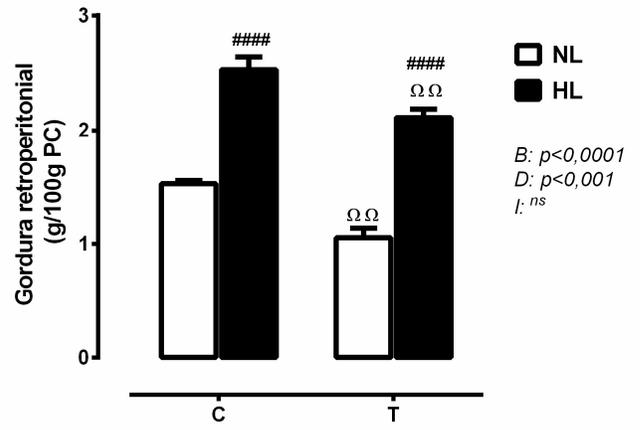


FIGURA 4

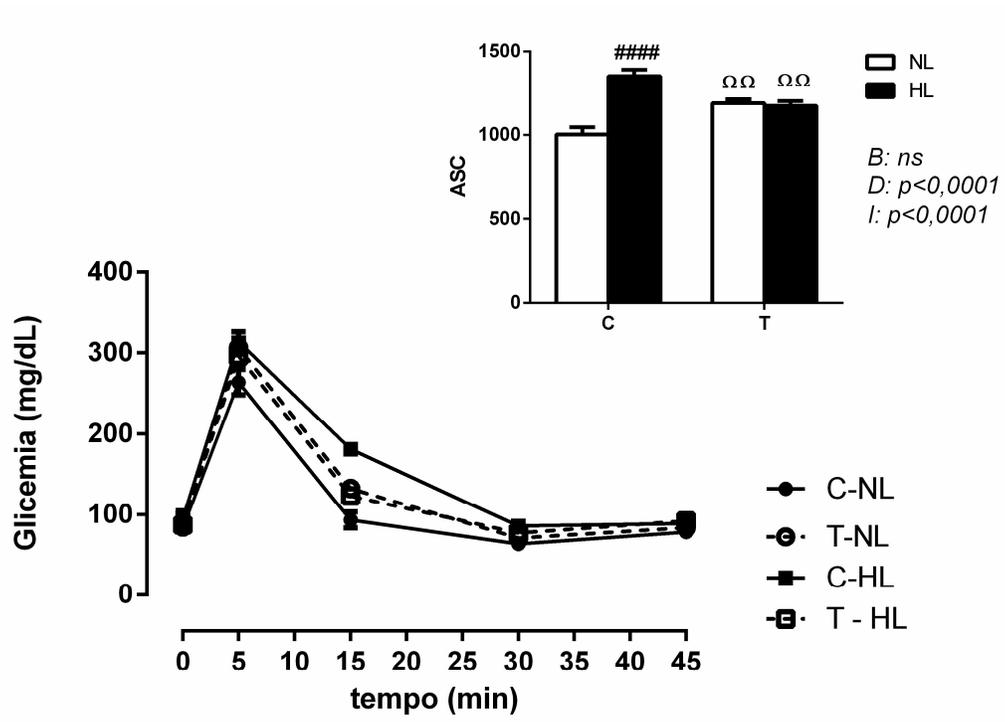
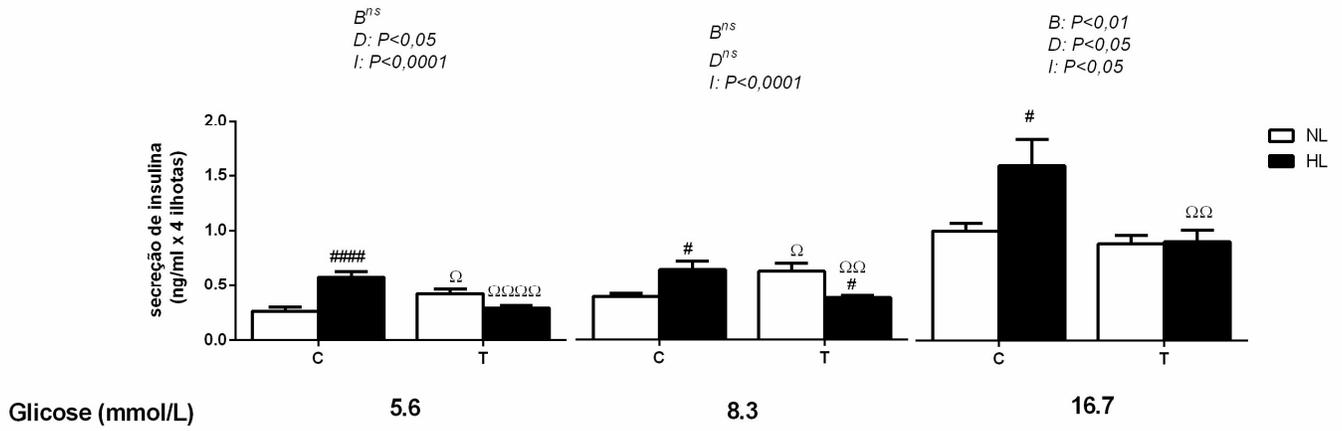
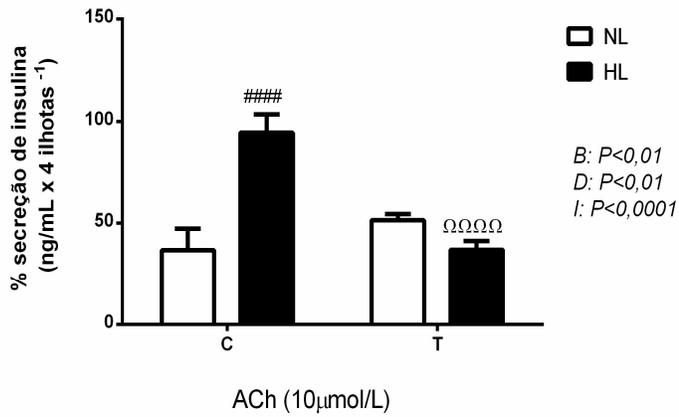


FIGURA 5

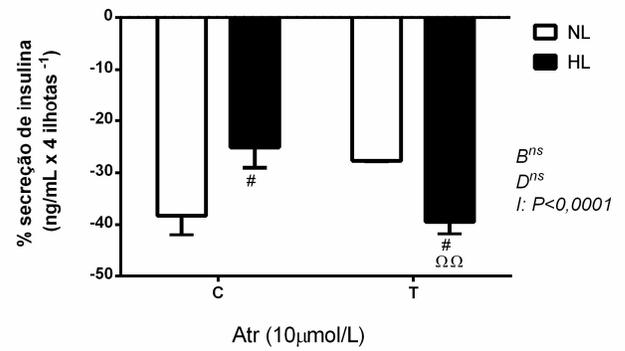
A



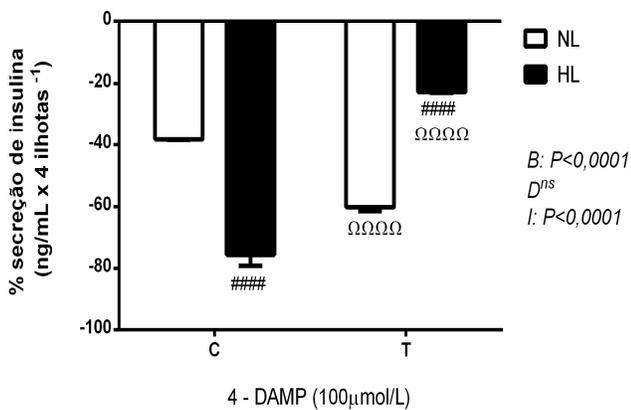
B



C



D



E

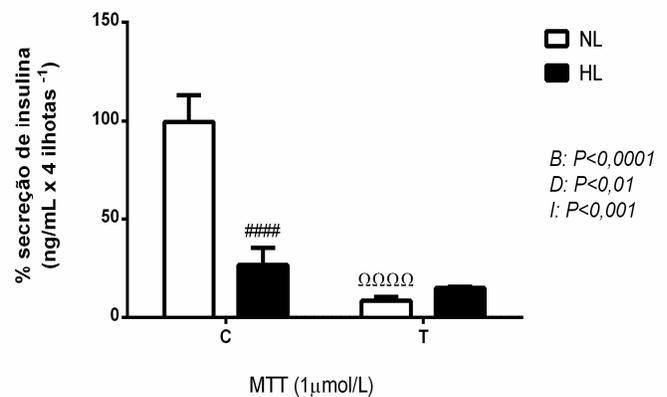
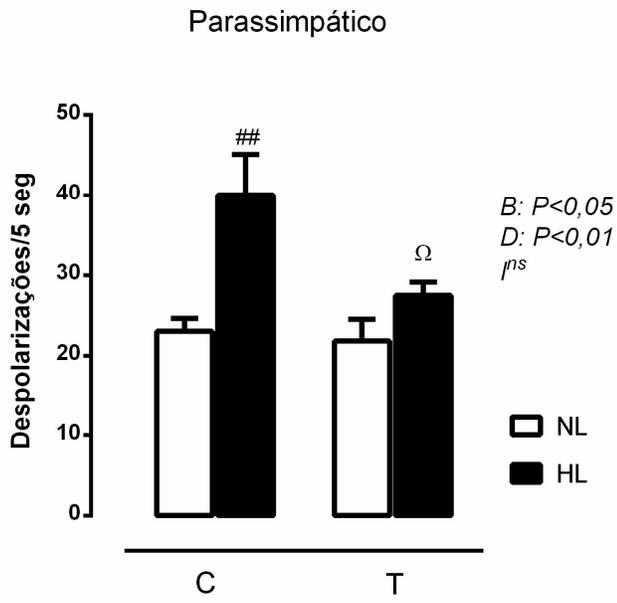


FIGURA 6

A



B

