

Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

**EFEITO DOS EXERCÍCIOS AERÓBIO CONTÍNUO E COM
PESOS COMBINADOS SOBRE A SINALIZAÇÃO
INSULÍNICA E TRANSPORTADOR DE GLICOSE EM
MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS OBESOS**

Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior

Presidente Prudente

2012

Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior

**EFEITO DOS EXERCÍCIOS AERÓBIO CONTÍNUO E COM
PESOS COMBINADOS SOBRE A SINALIZAÇÃO
INSULÍNICA E TRANSPORTADOR DE GLICOSE EM
MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia – FCT/UNESP, Campus de Presidente
Prudente, para a obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós – Graduação em Fisioterapia

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente

2012

ii



P728e Pinto Júnior, Danilo Antônio Corrêa.
Efeito dos exercícios aeróbio contínuo e com pesos combinados sobre a sinalização insulínica e transportador de glicose em musculatura esquelética de ratos obesos / Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior. - Presidente Prudente : [s.n], 2012
74 f.

Orientador: Patricia Monteiro Seraphim
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia

1. Sinalização Insulínica. 2. Transportador de Glicose. 3. Exercício Físico. I. Seraphim, Patricia Monteiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Patrícia Monteiro Seraphim

PROFA. DRA. PATRÍCIA MONTEIRO SERAPHIM
(ORIENTADORA)

Doris Hissako Sumida

PROFA. DRA. DORIS HISSAKO SUMIDA
(UNESP/ARAÇATUBA)

Henrique Luiz Monteiro

PROF. DR. HENRIQUE LUIZ MONTEIRO
(UNESP/BAURU)

Daniilo Antônio Corrêa Pinto Junior

DANILO ANTÔNIO CORRÊA PINTO JUNIOR

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 27 DE JANEIRO DE 2012.

RESULTADO: _____

Aprovado

DEDICATÓRIA

À minha mãe Adriana, pelo companheirismo, amor e sabedoria para me
conduzir sempre pelo caminho correto.

Dedico – lhe esse trabalho, pois não somente o meu, mas o teu suor também se fez
presente nestes anos todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, em que eu achava estar sozinho, mas de algum modo “ele” estava comigo.

À minha mãe, que nas horas em que o caminho mais fácil era desistir, me incentivou para que eu continuasse lutando, pois a vida era difícil para todos nós e se eu quisesse realmente algo bom, teria que lutar com todas as minhas forças para conseguir. Obrigado mãe pelo exemplo de pessoa que você foi e é para mim sempre.

Ao Nicola que mesmo não tendo o mesmo sangue que corre em minhas veias, foi um exemplo, demonstrando ter um bom coração e caráter imprescindível. Obrigado Ni por tudo que você representa/ou.

Aos meus avós Antônia e José, que mesmo com toda a distância nunca deixaram de transmitir seu carinho por mim, sejam com orações todos os dias ou até mesmo com mimos durante minha permanência em casa. Obrigado por tudo.

Aos meus irmãos Monique e Murilo, que compreenderam minha ausência em suas vidas, obrigado pela compreensão e por existirem, amo vocês.

Aos meus tios e primos Rose, Luís, Rafael e Andressa, que sempre mandaram mensagens de incentivo e me faziam chorar de saudades em frente a webcam, obrigado.

À minha tia Marjorie, que sempre me ajudou nos momentos que precisei. Obrigado de coração.

Ao meu pai de criação Ênio, que esteve sempre presente em minha vida.
Obrigado por tudo.

Ao meu melhor amigo Wesley, pelos luais, conversas e amizade. Obrigado amigo.

À Eva, pelos momentos de amizade incondicional, companheirismo e amor.
Obrigado, amo você.

Aos meus amigos de república Dú, Mau, João, Gui, Renan, Fê, Cesinha, Crys e Bixão, pelas horas de conversa e descontração que passamos juntos. E aos dois últimos (Crys e Bixão) obrigado por sempre me ajudar nas vezes em que eu precisei e por me “escutar” sempre.

A todos os integrantes que passaram pela Bateria Furiosa e proporcionaram momentos de alegria em minha vida acadêmica.

À Aninha e toda sua família, sua avó Edna principalmente, pela ajuda com minha estadia nos dias em que fiquei em Araçatuba. Obrigado pela hospitalidade.

À família Manzano, por sempre me tratar como um filho e me ajudar sempre que possível. Obrigado Ciro, Tina e Caio.

Ao Vi, que mesmo longe, provou a todos toda a força e determinação e que hoje está em um lugar melhor. *Requiescat in pace* meu amigo.

Ao meu aluno de Jiu Jitsu Caike, pelo exemplo de garra e determinação.

Aos vigilantes da FCT – UNESP, César, Moisés e Francisco pelas conversas sobre futebol e pelos copos de café durante as madrugadas no laboratório.

Aos professores Zeca e Luís Carlos, por disponibilizar a utilização do Biotério.

Aos professores Marcelo Papoti e Olga Malheiro pela colaboração para com este trabalho.

Ao André da Pós – Graduação, pela ajuda nos momentos em qual eu precisei.

À professora Dóris Hissako Sumida pela grande colaboração neste trabalho e às suas alunas pela ajuda com os experimentos de Western Blotting, obrigado a todas.

Ao professor Ubiratan Fabres Machado pela disponibilidade da utilização de seu laboratório.

Aos integrantes do Laboratório de Pesquisa em Fisiologia:

Leidi, pelas conversas e discussões sobre Western Blotting; Lidi, por sempre me ajudar nos momentos em que ninguém tinha disponibilidade para tal; Rafa e Neto por ajudarem efetivamente na execução deste trabalho (até mesmo no dia de natal e ano novo), obrigado de coração pela ajuda, pois sem vocês a realização deste trabalho não seria possível; À Bruna que sempre me ajudava a pensar em algo que eu não havia pensado antes, pelas discussões e conversas durante a rotina no laboratório, obrigado por fazer parte da minha vida acadêmica; Por fim, à professora Patricia Monteiro Seraphim, pela real orientação e confiança no meu trabalho. Obrigado de coração Paty, pelos ensinamentos e amizade.

À Camila, que nesta fase da minha vida foi minha amiga, companheira e namorada, obrigado por tudo que você fez e faz por mim, pelo amor e dedicação em nosso relacionamento. Amo você.

Aos animais, que doaram a vida para a execução deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho... Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só... Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de si mesmos. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Esta é a mais bela realidade da vida... A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso...”

(Antoine de Saint – Exupéry)

"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.

O sucesso é construído à noite!

Durante o dia você faz o que todos fazem.

Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial.

Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.

Não se compare à maioria, pois, infelizmente ela não é modelo de sucesso.

Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.

Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.

Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.

A realização de um sonho depende de dedicação, há muita gente que espera que o sonho se realize por mágica, mas toda mágica é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está, em verdade a ilusão é combustível dos perdedores, pois...

Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO.

Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA."

(Roberto Shinyashiki)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. METODOLOGIA.....	29
2.1. Treinamento dos Animais.....	30
2.2. Análise Lactacidêmica (após 1ª semana de treino)	32
2.3. Índice de Lee	32
2.4. Teste de Tolerância à Insulina.....	32
2.5. Teste de Tolerância à Glicose	33
2.6. Análise Histológica.....	33
2.7. Coleta do Material.....	34
2.8. RT – PCR de GLUT4, SOCS3, CKm, GAPDH	35
2.8.1. Preparação das amostras RT – PCR.....	35
2.8.2. Obtenção do cDNA a partir do RNA total	35
2.8.3. PCR: GLUT4, SOCS3, CKM, GAPDH	36
2.9. Avaliação do grau de fosforilação de IRS	37
2.9.1. Preparação das amostras	38
2.9.2. Western Blotting.....	38
2.10. Metodologia de quantificação do GLUT4.....	40
2.10.1. Preparação das amostras para o Western Blotting.....	40
2.10.2. Western Blotting - Quantificação do GLUT4	41
2.11. Análise Estatística	42
3. RESULTADOS.....	43
3.1. Perfil Morfométrico.....	43

3.2. Evolução do peso corpóreo	43
3.3. Controle de ingestão calórica dos animais	45
3.4. Análise Lactacidêmica (após 1ª semana de treino)	46
3.5. kITT	46
3.6. TTG.....	47
3.7. Análise Histológica.....	48
3.8. PCR: GLUT4, SOCS3, CKM, GAPDH.....	49
3.9. Western Blotting IRS.....	52
3.9.1. Grau de fosforilação em Serina ³⁰⁷ do IRS – 1	53
3.9.2. Grau de fosforilação em Tirosina da pp185	54
3.10. Western Blotting GLUT4	54
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66
7. ANEXOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 – Modelo da Plataforma de Força	30
Figura 2 – Evolução do Peso Corpóreo	44
Figura 3 – Imagens dos Animais	44
Figura 4 – kITT	46
Figura 5 – TTG	47
Figura 6 – Análise Lactacidêmica (Após a 1ª semana de treino)	48
Figura 7 – Análise Histológica do Músculo Gastrocnêmio.....	49
Figura 8 – Conteúdo de RNAm de GLUT4	50
Figura 9 – Conteúdo de RNAm de CKM	51
Figura 10 – Conteúdo de RNAm de SOCS3	52
Figura 11 – Grau de Fosforilação do IRS – 1 em Serina ³⁰⁷	53
Figura 12 – Grau de fosforilação da pp185 em tirosina.....	54
Figura 13 – Conteúdo Proteico de GLUT4 no Músculo Sóleo.....	55
Figura 14 – Conteúdo Proteico de GLUT4 no Músculo EDL.....	56

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 – Composição Nutricional dos Alimentos Presentes na Dieta	29
Tabela 2 – Perfil Morfométrico dos Animais	43
Tabela 3 – Controle de Ingestão Alimentar	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AKT/PKB	Proteína Serina/Treonina Quinase B
BSA	Soro de Albumina Bovina
CKm	Creatina Quinase muscular
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
GLUT4	Transportador de Glicose 4
GEF	<i>GLUT4 Enhancer Factor</i>
HIF – 1a	<i>Hypoxia Induced Factor – 1a</i>
I	Insulina
IKK β	Quinase Inibidora do NF κ – B
IL – 6	Interleucina 6
IR	Receptor de Insulina
IRS – 1	Substrato 1 do Receptor de Insulina
IRS – 2	Substrato 2 do Receptor de Insulina
IRS – 3	Substrato 3 do Receptor de Insulina
IRS – 4	Substrato 4 do Receptor de Insulina
IRs	Substratos do Receptor de Insulina

IU	Unidades Internacionais
i. v.	Intravenosa
JAK2	<i>Janus Kinase – 2</i>
JNK	<i>c – Jun NH₂ – Terminal kinase</i>
kDa	Quilodalton
kITT	Constante de Decaimento de Glicose
LPS	Lipopolissacarídeo
MEF2A	<i>Myocyte Enhancer Factor 2A</i>
MEF2D	<i>Myocyte Enhancer Factor 2D</i>
m – TOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NFκ – B	Fator de Transcrição Nuclear kappa – B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDK – 1	<i>Phosphoinositide – Dependent Kinase – 1</i>
PDK – 2	<i>Phosphoinositide – Dependent Kinase – 2</i>
PH	Sítio de Homologia à Plecstrina
PI3 – K	Fosfatidilinositol 3 – Quinase
PKCα	Proteína Quinase C Alfa
PKCδ	Proteína Quinase C Delta
PTB	Domínio de Ligação Fosfotirosina

pY	Fosfotirosina
RI	Resistência Insulínica
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT – PCR	Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS – PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SOCS	Supressor de Sinalização de Citocina
SOCS3	Supressor de Sinalização de Citocinas – 3
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição – 3
TLRs	<i>Toll – Like Receptors</i>
TLR4	<i>Toll – Like Receptor – 4</i>
TNF – α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRIS	Tri(hidroximetil) – aminometano
TTG	Teste de Tolerância à Glicose
TTI	Teste de Tolerância à Insulina
UV	Ultravioleta

RESUMO

Palavras chave: Sinalização Insulínica; GLUT4; Exercício Físico; Inflamação.

A obesidade é uma condição que afeta muitos indivíduos e está relacionada a vários tipos de disfunções, como a resistência insulínica. Esta patologia se dá devido a uma falha na sinalização entre o hormônio, proteínas intracelulares e o GLUT4 em células musculares e adiposas. Alguns fatores contribuem para aumentar esta falha, como o aumento da fosforilação em serina do IRS – 1 e atividade pró - inflamatória. Uma maneira indireta de se avaliar o grau de inflamação é analisar a expressão do SOCS3, que está mais expresso quando há maior atividade inflamatória. A prática de exercício físico aparece como uma importante ferramenta, pois melhora a sensibilidade insulínica e pode aumentar a expressão do transportador de glicose até mesmo em animais obesos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos exercícios aeróbio contínuo e com pesos combinados sobre a via de sinalização da insulina e expressão de transportador de glicose GLUT4 em músculos de ratos obesos. Foram utilizados 80 ratos Wistar subdivididos em 4 grupos, Controle Sedentário (CS), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS) e Obeso Exercício (OE). Aos grupos obesos foi ofertada dieta ocidental com alimentos hiperlipídicos. Os animais exercitados foram submetidos a dois protocolos de exercício, aeróbio e com pesos por seis semanas. O exercício aeróbio foi desenvolvido em um ergômetro. O modelo com pesos foi feito em aparelho para realização de movimento "squat jump". Os animais foram anestesiados para retirada dos músculos extensor

análise da expressão da proteína GLUT4 e da fosforilação em serina³⁰⁷ e tirosina do IRS foi utilizada a técnica de Western Blotting. Os animais obesos apresentaram peso, adiposidade periepídimal e índice de massa corpórea superior aos animais controle, mostrando que a dieta empregada induziu a obesidade nestes grupos. Os animais OS apresentaram menor sensibilidade insulínica que os demais, quando submetidos ao Teste de Tolerância à Insulina e o exercício nos obesos melhorou esse quadro de resistência. Quando testados para a tolerância à glicose, os animais obesos tiveram leve tendência a captar menos glicose sanguínea. A hipertrofia do músculo Gastrocnêmio dos grupos obesos foi superior quando comparados com os controles. No EDL o grupo CE apresentou aumento do conteúdo de RNAm do GLUT4 quando comparado com CS, e somente o grupo OE apresentou maior conteúdo de RNAm de CKm quando comparado com OS. A fosforilação em serina e tirosina do IRS não foi diferente entre os grupos, porém o grupo OS tem discreto aumento da fosforilação em serina quando estimulado com insulina. A expressão proteica de GLUT4 só foi significativa na fração de membrana microssomal do grupo OE vs CS quando estimulados com insulina, embora há discreta redução na expressão desta proteína no grupo OS. Portanto conclui – se que a dieta ocidental causou malefícios provenientes de um quadro de obesidade bem instalado e os exercícios aeróbio contínuo e com pesos combinados foram eficazes para melhorar alguns destes males causados pelo excesso de adiposidade.

ABSTRACT

Key words: Insulin Signaling; GLUT4; Physical Exercise; Inflammation.

Obesity is a condition that affects many people and is related with some kind of diseases, like insulin resistance. This pathology occurs because of an impairment on activation of GLUT4 machinery (insulin signaling, activation of intracellular proteins) in skeletal muscle and adipose tissue. Some factors contribute directly with this illness, like increase IRS – 1 serine phosphorylation and pro – inflammatory activity. An indirect way to measure inflammation is to analyze expression of SOCS3, because when it is overexpressed means that there are more pro – inflammatory activity. Literature shows that physical exercise can improve insulin sensitivity by increases of GLUT4 expression even in obese rats. So we aimed to evaluate the effect of combined aerobic continuous and weight – lifting exercise on insulin signaling and GLUT4 expression on skeletal muscle of obese rats. Eighty Male Wistar rats caged in four groups, Sedentary Control (SC), Exercised Control (EC), Sedentary Obese (SO) and Exercised Obese (EO). Obese were fed with Western Diet, composed by hyperlipidic food. Exercised animals were submitted to two exercise protocols, aerobic continuous exercise in a treadmill and weight – lifting exercise involving jumps on a metal platform. Animals were anesthetized and Soleus, Gastrocnemius and Long Extensor of the Digits (LED) were removed for GLUT4 protein quantification and phosphorylation of IRS in Serine and tyrosine analyzed by Western Blotting, and mRNA content analysis of GLUT4, CKm and SOCS3 by RT –

PCR technique. Obese presented increase of body weight, adipose tissue weight and body mass index when compared with control, showing that Western Diet induced obesity in this population.

The group SO presented decrease of insulin sensitivity when compared with other groups and exercise improved the sensitivity on ITT. On GTT, obese animals showed a slight tendency to decrease glucose blood uptake. Gastrocnemius hypertrophy of obese showed more hypertrophy than control animals. In LED, EC showed increase on GLUT4 mRNA content compared to SC, and only CKm expression was higher in EO when compared with SO. IRS – 1 phosphorylation in serine and tyrosine was not different among groups, however SO group presented a discrete increase of phosphoserine and a decrease of phosphotyrosine when stimulated by insulin. GLUT4 expression was significant in microsomal membrane fraction in EO group when compared with SC, after insulin stimulation, although there is discrete reduction of content of this protein in SO group. So concludes that Western diet caused some damages in obese and combined aerobic continuous and anaerobic exercise was efficient to improve some aspects caused by adiposity excess.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a obesidade é um estado metabólico que atinge grande parte da população mundial (cerca de 1,5 bilhão de adultos tem sobrepeso e 200 milhões são obesos), mas se transportarmos este quadro para as crianças podemos observar claramente que esta realidade também está presente nesta classe, pois segundo a Organização Mundial da Saúde, existem cerca de 43 milhões de crianças (com menos de 5 anos) com sobrepeso (OMS, 2011).

A obesidade é caracterizada pelo aumento expressivo dos estoques de ácidos graxos. Este aumento significativo da adiposidade está intimamente relacionado com o aparecimento de algumas patologias (doenças cardiovasculares, doenças hepáticas, resistência hormonal). As razões que levam o indivíduo a se tornar obeso não são exclusivamente únicas, pois o indivíduo pode se tornar obeso desde fatores comportamentais e ambientais, até fatores genéticos e metabólicos (DÂMASO, 2003).

Um dos estados metabólicos que geralmente é encontrado em indivíduos obesos é um quadro de dislipidemia, que é basicamente uma descompensação dos níveis de colesterol. O aumento das concentrações de Ácidos Graxos Livres (AGL) acarreta na formação de lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente) e na redução de proteínas de alta e muito alta densidade (HDL e VHDL, respectivamente), levando assim a um quadro aterosclerótico e, com o passar do tempo, ao aumento da pressão arterial até que ocorra o infarto do miocárdio. Essa disfunção dislipidêmica pode também ser prejudicial às células B pancreáticas, levando assim o indivíduo a desenvolver o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (MATIA *et al.*, 2007; STENGHEL *et al.*, 2007).

Nas duas últimas décadas a incidência do DM2 aumentou significativamente (atingindo cerca de 150 milhões de pessoas no mundo) (ZIMMET *et al.*, 2001).

Este tipo de diabetes é comumente encontrado em populações obesas, visto que estas duas doenças estão diretamente relacionadas (MOKDAD *et al.*, 2003; BASTARD *et al.*, 2006). Essas duas patologias associam-se de forma direta à resistência insulínica (RI), que é um déficit das funções normais da insulina (REAVEN, 1988). Em suma, o DM2 inicia-se com a RI que, numa situação crônica, leva à perda da função das células B pancreáticas, que é produzir insulina (MATIA *et al.*, 2007; STENGHEL *et al.*, 2007).

Segundo um levantamento feito pela Sociedade Brasileira de Diabetes, além de afetar a qualidade de vida dos indivíduos, o DM2 têm impactos negativos para a sociedade e para a saúde pública, principalmente por ser uma das doenças que geram maior comprometimento do orçamento da saúde (BAHIA *et al.*, 2011).

Já está bem descrito na literatura que um dos fortes indicativos para que o indivíduo se torne primeiramente resistente à ação da insulina e posteriormente diabético, é um estado inflamatório bem caracterizado. Estudos mostram que a correlação entre DM2 e marcadores inflamatórios como: Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α) e proteína C reativa é relativamente alta (VALERIO, 2006; PANVELOSKI – COSTA *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2006).

A literatura mostra que estado de inflamação crônica está intimamente associado com a obesidade, DM2 e RI (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005). HOTAMISLIGIL *et al* verificaram que o TNF- α (citocina pró- inflamatória) era superexpresso no tecido adiposo branco de camundongos obesos e que isso afetava a sensibilidade insulínica dos animais. Isto foi evidenciado em humanos obesos pouco tempo depois, tanto no tecido adiposo (TA) quanto na musculatura

esquelética (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; KERN *et al.*, 1995).

Estudos posteriores mostraram a participação de outros marcadores inflamatórios além do TNF- α , evidenciando que citocinas pró-inflamatórias também tem sua expressão aumentada em tecidos periféricos (TA, musculatura) tanto de modelos animais de obesidade quanto em humanos obesos (DANDONA *et al.*, 2004).

A inflamação afeta negativamente a sensibilidade à insulina, fazendo com que o sinal dado pelo hormônio seja diminuído, levando assim o indivíduo a desenvolver a RI. Em situações normais, a insulina é produzida e liberada pelas células B pancreáticas num estado pós prandial. A insulina tem como alvo tecidos periféricos sensíveis à insulina (musculatura e tecido adiposo) que, através de uma ligação em receptor específico de insulina, desencadeia reações intracelulares que irão ativar transportadores de glicose presentes no microsoma da célula, fazendo com que estes migrem para a membrana plasmática e assim façam a captação da glicose sérica por meio de difusão facilitada (MACHADO *et al.*, 2006).

A sinalização da insulina ocorre quando há a ligação em seu receptor, o qual é uma proteína heterotetramérica, composto por duas subunidades extracelulares (α) e duas subunidades transmembrânicas (β) ligadas entre si por pontes dissulfeto ($\alpha_2\beta_2$). Quando ocorre a ligação da insulina nas subunidades α , é ativada uma reação de autofosforilação acionando assim as subunidades β , que por sua vez se autofosforilam em vários resíduos de tirosina (Tyr⁹⁶⁰, Tyr¹¹⁴⁶, Tyr¹¹⁵⁰, Tyr¹¹⁵¹, Tyr¹³¹⁶, Tyr¹³²²) (WHITE e KAHN, 1994). Uma proteína chave que é ativada a partir desta atividade tirosina quinase é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS – 1), que foi o primeiro a ser identificado dentre os substratos deste receptor (WHITE, 2002). O IRS – 1 é uma proteína composta por 1.243 aminoácidos e possui uma massa molecular

de 165 a 185 kDa (LEE e PILCH, 1994). Todos os membros da família de substratos de receptores de insulina (IRS – 1, IRS – 2, IRS – 3 e IRS – 4) possuem um sítio de homologia à Plecstrina (PH) que permite a interação com proteínas com domínio SH2 e um domínio de ligação fosfotirosina próximo a região N – terminal (PTB) (RAVICHANDRAN, 2001). Quando ocorre a autofosforilação do receptor de insulina em resíduos de tirosina, estes resíduos se ligam no domínio PTB ativando assim o IRS – 1, que por sua vez interage com proteínas efetoras com domínios SH2 (SALTIEL e KAHN, 2001), como a fosfatidilinositol 3 – quinase (PI3 quinase). A PI3 – quinase é uma proteína dimérica composta por uma subunidade catalítica e uma regulatória. A subunidade catalítica é ativada após a ligação entre proteínas IRSs e domínios SH2 da subunidade regulatória (BACKER *et al.*, 1992). Quando ativada, a PI3 – quinase gera alguns inositídeos que ficam próximo à membrana plasmática (fosfatidilinositol 3, 4 bifosfato e fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato) e atuam como moléculas de reconhecimento para proteínas com atividade serina/treonina quinase. As quinases dependentes de fosfoinositol – 1 e - 2 (PDK – 1 e PDK – 2) participam da ativação da proteína quinase B (PKB ou AKT) e, por possuir também um domínio PH, a AKT interage com os inositídeos de membrana derivados da PI3 – quinase, fazendo com que a PKB fique ativa (ALESSI e COHEN, 1998). Quando fosforilada (em resíduos de Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸) (YUNG *et al.*, 2011), a AKT se torna ativa e desempenha algumas funções celulares, como captação de glicose, síntese de glicogênio e síntese proteica por exemplo.

Em indivíduos obesos, que possuem uma maior atividade inflamatória (pois o tecido adiposo produz e secreta citocinas inflamatórias como TNF – α e IL – 6), ocorre uma diminuição da atividade tirosina quinase do receptor de insulina e IRS, pois com a inflamação as fosforilações do receptor de insulina e de seus substratos

são em resíduos de Ser³⁰⁷, mecanismo pelo qual leva a uma menor ativação de proteínas intracelulares como PI3 – quinase, AKT e GLUT4 e conseqüentemente uma menor captação de glicose (LÉGER *et al.*, 2008). Tal fenômeno propicia um quadro de resistência à insulina e mais cronicamente o DM2 (DUARTE *et al.*, 2006).

Quando há o aumento da expressão destas citocinas inflamatórias, há o aumento diretamente proporcional da expressão da proteína supressora de citocinas 3 (SOCS3). Esta proteína modula a via ativada pelas citocinas (JAK1/STAT2), fazendo uma ligação nos receptores JAK ou à cauda citoplasmática dos receptores de citocinas (GREENHILL, 2011). Estudos com ratas Sprague – Dawley que eram submetidas à um protocolo de exercício em esteira rolante evidenciam que ocorre um aumento da expressão gênica de RNAm de IL – 6. Isso faz com que ocorra uma ação negativa direta na via de sinalização da insulina, já que quando há um aumento da expressão de SOCS3 em paralelo a este aumento ocorre também uma menor expressão da AKT, proteína chave na cascata de sinalização dado pela insulina através de ligação com seu receptor, indicando uma atividade pró – inflamatória na célula que está inibindo de certa forma a sinalização insulínica e, conseqüentemente, afetando negativamente a homeostase glicídica (LÉGER *et al.*, 2008).

Alguns autores sugerem o exercício físico como um forte contribuinte para a manutenção da homeostasia glicídica, pois melhora a sensibilidade à insulina, auxiliando na redução de massa adiposa e com isso diminuindo atividade pró – inflamatória e aumentando a massa muscular (JESSEN e GOODYEAR, 2005). Foi demonstrado que o exercício aeróbio contribui positivamente para o aumento da captação de glicose devido a um aumento de expressão proteica de GLUT4 no sarcolema e túbulos T da musculatura esquelética de ratos. Foi demonstrado

também que há um aumento da captação de glicose em indivíduos treinados quando comparados com pessoas sedentárias, com um aumento de 66% no conteúdo de GLUT4 nos treinados (YONEMITSU *et al.*, 2001). A contribuição deste tipo de protocolo de exercício se dá devido à beta – oxidação de ácidos graxos livres (AGL), fazendo com que estes sejam metabolizados ao invés de serem armazenados em forma de triacilglicerol (TALANIAN *et al.*,2007). Entretanto, como o exercício com pesos ativa mais a via glicolítica e os AGL não são recrutados predominantemente, a literatura apresenta que após algumas semanas, o exercício com pesos faz com que o indivíduo tenha um aumento da secção transversa do músculo (hipertrofia), aumentando assim a área de captação de glicose, a taxa metabólica de repouso (aumentando a beta oxidação de AGL durante o repouso) e também o consumo de energia pós – exercício (EPOC) (MEIRELLES e GOMES, 2004).

O exercício com pesos é caracterizado por ter intensidade mais alta e menor tempo de duração, portanto há maior recrutamento da via ATP – CP e da via glicolítica. Durante os primeiros segundos de exercício, a via predominante é a via ATP – CP (aproximadamente 10 a 20 segundos). A função da fosfocreatina (CP) é a ressíntese do ATP. Quando a fosfocreatina é quebrada, o ADP recebe um grupamento fosfato da CP e se transforma em ATP novamente, a proteína que catalisa esta reação é a creatina quinase (CKm). O aumento da expressão desta proteína é um indicativo de que a musculatura está tendo atividade anaeróbia por mais tempo através da via aláctica (sem produção de lactato). Estudos apontam que animais *knockout* para CK muscular não apresentam um pico de força quando comparados com animais saudáveis durante eletroestimulação, mostrando claramente que esta é uma proteína chave para exercícios de alta intensidade e baixo tempo de duração (BRIAN *et al.*, 2002).

Assim, o estudo objetiva avaliar o efeito das atividades aeróbia contínua e com pesos combinadas sobre a sinalização da insulina e expressão gênica e proteica do transportador de glicose 4 (GLUT4) em musculatura esquelética de ratos obesos. O estudo tem como objetivo também investigar a expressão de RNAm tanto da proteína supressora da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) para correlacionar com possíveis alterações encontradas na via de sinalização da insulina quanto de RNAm de CKm para evidenciar o tipo de via metabólica que está sendo predominantemente utilizada.

2. METODOLOGIA

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22°C a 24°C e com ciclos de luz artificial (12 horas claro e 12 horas escuro). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual Paulista (Processo N°79/2009, vide anexo 1).

Foram utilizados 80 ratos machos Wistar subdivididos em 4 grupos: Controle Sedentário (CS); Controle Exercício (CE); Obeso Sedentário (OS) e Obeso Exercício (OE) totalizando 20 animais por grupo. Os animais do grupo OS e OE foram alimentados com uma dieta hipercalórica (dieta ocidental) composta por: mortadela, bacon, salsicha, bolacha recheada e refrigerante após o desmame, por oito semanas (LAMAS, *et al.*, 2004) (RIBOT, *et al.*, 2008). Todos os grupos (CS; CE; OS e OE) foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

Tabela 1 – Composição nutricional dos alimentos presentes na dieta

Alimento	Macronutrientes e valor calórico			
	Kcal	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)
Bacon	609	8,04	62,81	2,93
Bolacha	487	6,82	20,03	70,39
Mortadela	301	17,6	17,18	19,09
Refrigerante	41,67	0g	0g	10,48
Salsicha	265	10,18	22,55	5,45
Ração	378	23,00	4,00	49

*Valor por 100g de alimento (refrigerante por 100 ml).

Após oito semanas de dieta, quando o peso corpóreo do grupo obeso estava bem superior aos animais do grupo controle, o treinamento foi iniciado.

2.1. Treinamento dos animais

O protocolo de treinamento consistiu em três séries de 12 repetições com intervalo de um minuto entre as séries (exercício com pesos), recuperação passiva de dois minutos (intervalo), e 10 ou 20 minutos de exercício (por questões adaptativas dos animais ao aparelho) em esteira rolante (aeróbio contínuo), por seis semanas.

• Treino com pesos

O modelo de treinamento de força usado foi o proposto por TAMAKI *et al.*, 1992, com algumas adaptações.

Foi utilizado um aparelho que foi desenvolvido pelos alunos do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da FCT UNESP de Presidente Prudente no qual o animal ficou imobilizado a um colete adaptado sobre uma plataforma metálica. Uma estimulação elétrica foi dada na cauda do animal (10 V, 0.3s de duração com 2s de intervalo), através da plataforma em que ele se encontrava. Com esta estimulação o rato saltava, levantando o peso que estava na haste do aparelho (Figura 1). O movimento “squat jump” foi testado e validado como indutor de hipertrofia em animais, semelhante à hipertrofia obtida em humanos levantadores de peso. (UCHIYAMA, *et al.*, 2006).

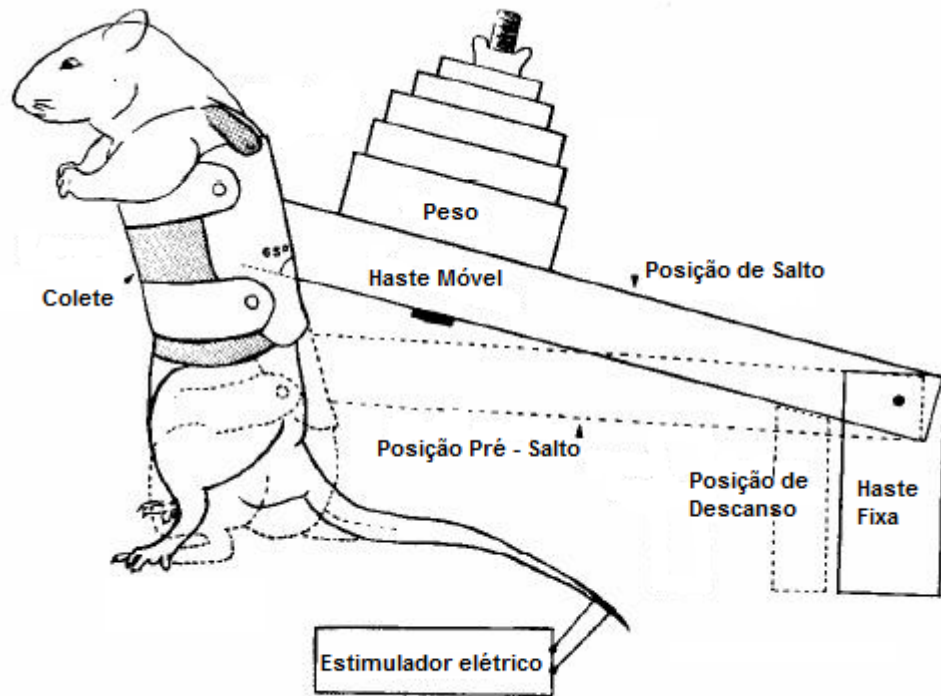


Figura 1 – Modelo da plataforma de força, adaptado do proposto por TAMAKI *et al.*, 1992.

Fonte: TAMAKI, T. *et al.* A weight-lifting exercise model for inducing hipertrophy in the hindlimb muscles of rats. 1992

Para a predição da intensidade do treino os animais foram pesados todos os dias e o peso trabalhado foi obtido através de porcentagens do peso corporal total. A intensidade também foi elevada gradualmente, por questões adaptativas (50 a 60% da massa corporal total). (BARAUNA, *et al.*, 2005).

• Treinamento Aeróbio Contínuo

O treinamento aeróbio contínuo foi desenvolvido em um ergômetro, uma vez ao dia. O tempo de iniciação foi de 10 minutos durante as duas primeiras semanas, aumentando progressivamente por questões adaptativas ao material e à atividade física, sendo que nas quatro últimas semanas o tempo de treinamento foi de 20 minutos. O treinamento foi realizado três dias por semana a uma velocidade de

0,567 Km/h.

2.2. Análise da Lactacidemia (após a 1ª semana de treino)

Para destacar a utilização das vias metabólicas, foi realizada a análise lactacidêmica, a fim de constatar se durante os protocolos de exercício as vias glicolítica láctica e oxidativa estavam sendo recrutadas. Para isso foram obtidas amostras de 25 µL de sangue coletadas por punção caudal de animais dos grupos exercitados, em capilar heparinizado. Estas amostras foram imediatamente transferidas para microtubos de 1,5 mL, contendo 50 µL de solução de NaF a 1% e armazenadas em gelo, para leitura eletro-enzimática (YSL 2700 STAT, Yellow Springs Co., EUA). As amostras de sangue foram coletadas uma semana após o início dos treinamentos aeróbio contínuo e com pesos.

2.3. Índice de Lee

Como indicativo de massa corpórea, foi calculado o Índice de Lee (similar ao IMC para humanos), que é a raiz cúbica do peso corpóreo em gramas dividido pelo comprimento naso – anal em centímetros x 100.

2.4. Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Antes do início do treinamento e uma semana antes do sacrifício foi realizado o TTI a fim de verificar a sensibilidade dos animais ao hormônio. Após ficarem de jejum por 6 horas, os animais receberam uma dose de insulina via intraperitoneal

(1IU/kg peso corpóreo) e foi avaliada a glicemia por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil) nos tempos 0 (basal - antes da administração do hormônio) e de 5 em 5 minutos até 30 minutos. Foi calculada a constante de decaimento de glicose ao longo do teste, o que chamamos de kITT (expresso em % de decaimento de glicose por minuto⁻¹).

2.5. Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

O TTG foi feito antes do início do treinamento e uma semana antes do sacrifício, após ficarem 8 horas de jejum, foi administrando 1,5g glicose/Kg do peso corpóreo via intraperitoneal em solução a 20% de glicose em salina 0,9%. As amostras de sangue foram coletadas antes da aplicação de glicose (tempo 0) e a 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. Foi realizada uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal e a glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil).

2.6. Análise Histológica

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a Prof^a Dr^a Olga Cristina de Mello Malheiro na própria instituição.

Foram analisadas 10 lâminas com cortes de cinco μm de espessura, produzidos em um micrótomo criostato rotativo, com espessura de cinco micrômetros (05 μm), e em seguidas coradas com Azul de Toluidina, para avaliação da área da secção transversa das fibras musculares. Foram observadas 200 fibras musculares em cada lâmina, de acordo com o protocolo estabelecido por MATHIEU

et al., 1981.

Os cortes submetidos à coloração Azul de Toluidina foram observados em microscópio óptico Zeiss Primo Star, fotomicrografados pela câmera Canon Power Shot A650 IS. Para avaliação do grau de hipertrofia das fibras musculares foi determinada por marcação interativa a área das amostras de 200 fibras por animal, pelo sistema de análise de imagem computadorizada, através do software AxioVision 4.8.

2.7. Coleta do Material

Após 24 horas da última sessão de treinamento os animais foram anestesiados via intraperitoneal por meio do anestésico Thiopental Sódico (60mg/kg peso corporal) e quando houve a perda dos reflexos corneanos e de retirada da pata à dor, foi realizada a laparotomia mediana, com a exposição da veia cava inferior e a veia porta hepática. Foram retirados tecidos antes e após uma carga insulínica (1,5 IU de insulina regular, i. v. Veia porta) nos tempos de 75 segundos para o Extensor Longo dos Dígitos (EDL) e Sóleo. Foi retirada a musculatura oxidativa e glicolítica a fim de semi – quantificar o RNAm de GLUT4, CKM, SOCS3 e GAPDH, e também para a quantificação tanto da proteína GLUT4 quanto para avaliação do grau de fosforilação de IRS – 1 em Serina³⁰⁷ e da pp 185. E foi retirada também a porção medial do músculo Gastrocnêmio para análise histológica. Essas amostras foram congeladas por imersão em N – Hexana resfriada a – 70°C em nitrogênio líquido, pelo método de congelamento de tecidos não fixados e posteriormente armazenados em botijão de nitrogênio líquido para posterior análise.

2.8. Semi – quantificação do RNAm dos genes do GLUT4, da SOCS3, da Creatina Quinase (CKm) e do GAPDH (gene constitutivo)

Para a semi – quantificação do gene do GLUT4, da SOCS3, da CKM e do GAPDH, foi utilizada a técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase).

2.8.1. Preparação das amostras para o RT-PCR

As amostras de tecido muscular foram homogeneizadas em Homogeneizador modelo OMNI TH - USA (Lodan) com BRASOL (LGC Biotecnologia, Cotia – SP, Brasil) após a extração dos tecidos e assim estocados em - 70°C para posterior continuação do isolamento do RNA total (proporção: 0,1 g de tecido / 1mL de BRASOL). A obtenção do RNA total das amostras foi realizada de acordo com as instruções do folheto do BRASOL (LGC Biotecnologia).

A avaliação da concentração de RNA total foi feita utilizando-se 1 µL da amostra solubilizada de RNA total adicionado a 79 µL de água DEPC para leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, Amersham Biosciences, GE Healthcare) em 260 nm.

2.8.2. Obtenção da cDNA a partir do RNA total

Cinco µg de RNA total extraído dos tecidos foram submetidos à reação de transcrição reversa com primers randômicos para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm (cDNA). Para isto, foi adicionado em cada amostra: 1 µL de

RNAse Out (inibidor de RNAse – 40U), 4 µL tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 2 µL DTT (10 mM), 1 µL mistura de dNTPs (0,5mM cada), 2 µL primers randômicos (150ng) e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (Promega, USA), em volume final de 20 µL, completos com H₂O DEPC. Os RNAs foram incubados por 1 hora a 42° C na presença de 1 µL da enzima. Após este período as reações foram incubadas a 70° C por 2 minutos para desnaturação dos híbridos formados.

2.8.3. PCR para amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4, da SOCS3, da CKm e do GAPDH

Resumidamente o protocolo de PCR utilizado foi: 1 µl do produto final de RT (cDNA), juntamente com 10 pmol dos primers específicos para SOCS3 Sense: 5' - TTCAGCATCTCTGTCGGAAGAC - 3'; Antisense: 5' - CGGCAGCTGGGTGACTTT - 3' (37 ciclos, temperatura de anelamento 56°C – 113 pb); GLUT4 Sense: 5' - CCCCTCCAGGGCAAAGGAT - 3'; Antisense: 5' - TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3' (24 ciclos, temperatura de anelamento 54°C, 203 pb); GAPDH Sense: 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3'; Antisense: 5' - GAAGATGGTGATGGGATTTTC - 3' (40 ciclos, temperatura de anelamento 60°C, 119 pb); CKm Sense: 5' - ATTGATGACCACTTCCTGTT - 3'; Antisense: 5' - CTTCTTCATATTGCCTCCT - 3' (36 ciclos, temperatura de anelamento 59°C, 183 pb); foram submetidas à amplificação em 24 µl de um “mix” contendo 5,0 µl de tampão 10x Taq Polimerase (Prodinol), 0,5 µl de cada dNTP 10 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,125 µl da enzima Taq DNA Polimerase [5U/µl] (Promega, USA) e 15,875 µl de água Mili-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas com um passo inicial de

desnaturação do molde de cDNA a 95° C por 2 minutos. Em seguida foram realizados ciclos de desnaturação a 95° C por 2 minutos, anelamento com temperaturas específicas para cada primer conforme padronização de cada gene, e extensão de 72° C por 45 segundos. Por fim, o material foi resfriado a 4° C para a realização da eletroforese em gel de agarose. As incubações foram realizadas em termociclador automático Techne TC-312.

Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose – EtBr e visualizados com iluminação UV. As imagens foram adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação (KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc) e para análise densitométrica das bandas obtidas foi utilizado software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para este fim.

A expressão do RNAm para os genes SOCS3, GLUT4, CKm, foi normalizada pela expressão do GAPDH (proteína constitutiva), calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo.

2.9. Avaliação do Grau de fosforilação em tirosina da pp185 e em Serina³⁰⁷ do IRS – 1

Esta etapa foi realizada na Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária no Departamento de Ciências Básicas, Campus de Araçatuba, UNESP, com a colaboração da Profa. Dra. Dóris Hissako Sumida.

2.9.1. Preparação das amostras

Imediatamente após a extração (75 segundos para os músculos Sóleo e EDL estimulados com insulina), os tecidos foram homogeneizados em Polytron (24000 rpm durante 10 s) em 2 mL de tampão de extração (Tris 100mM pH 7,5; EDTA 10mM; SDS 10%; NaF 100 mM, Pirofosfato de Na 10 mM, Ortovanadato de Na 10mM), e mantidos em banho – maria (100°C) por 10 minutos, transferidos para gelo, e então centrifugados à 12000 rpm durante 40 minutos (4°C). Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para a determinação da concentração protéica pelo método de Bradford (Bio – Rad Protein Assay – Bio – Rad Laboratories, Hercules, USA), e foi realizada a leitura das concentrações pelo método de BRADFORD e para estoque em tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; SDS 10%; fosfato de sódio 1M pH 7,0; glicerol 50%; DTT 15%).

2.9.2. Western Blotting

Este método envolve as seguintes etapas:

●SDS – PAGE (gel de poliacrilamida)

Através deste método é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular.

Foi aplicado no gel 185 µg de proteína de extrato tecidual solubilizadas em tampão Laemmli. Imediatamente antes da aplicação as amostras foram fervidas por 5 minutos. A eletroforese foi realizada em equipamento para minigel da Bio – Rad e

a corrida no gel de “stacking” foi sob voltagem constante de 30 mV até que ocorra o empacotamento da amostra. Posteriormente foi aplicada uma voltagem constante de 100 mV para a corrida no gel de resolução durante 2 horas em contato a um tampão de corrida (Tris 50mM, glicina 375mM, SDS 0,1%, EDTA 1,8%).

Juntamente com as proteínas, foi colocado um padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos (marcador).

●Imunodeteção

Após a separação das frações protéicas no gel, foi feita a transferência eletroforética destas frações em membrana de nitrocelulose Hybond – C Super (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). A transferência foi realizada em voltagem constante de 100 V, durante 1 hora e 15 minutos à 4°C utilizando – se como tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%).

A membrana de nitrocelulose foi inicialmente incubada com uma solução bloqueadora (solução basal – SB – NaCl 150mM, Tris 10mM, “Tween 20 0,02%, pH 7,2 – acrescida de 5% de leite desnatado – 0% de gordura) durante 30 minutos a temperatura ambiente, e então lavada com solução basal por 3 sessões de 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com solução (Solução Basal+3% de leite desnatado) contendo os anticorpos específicos (anti – fosfotirosina ou anti – fosfoserina³⁰⁷ diluídos 1:400 e 1:2000 respectivamente) por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens com solução basal. Posteriormente foi feita uma incubação com os anticorpos secundários anti-IgG, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:10000, em solução bloqueadora BSA 1%

durante 1 hora. As membranas foram lavadas vigorosamente com tampão PBS e colocadas em contato com 3mL de reagente de detecção nº 1 acrescidos de 3mL de reagente de detecção nº2 do kit ECL™ – Western Blotting Detection Reagents (GEHealthcare, AMERSHAM Biosciences, UK) por 1 minuto.

Por fim, a membrana de nitrocelulose seca foi exposta a filme de RX (Hyperfilm – Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), durante um dia, a temperatura ambiente. O filme foi processado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA, São Paulo, BR).

A intensidade dos blots foi avaliada por densitometria óptica, utilizando – se um software (IMAGE MASTER 1D – Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

2.10. Metodologia de quantificação do GLUT4

A quantificação da proteína GLUT4 das amostras foi feita por meio da técnica de Western Blotting.

2.10.1. Preparação das Amostras para o Western Blotting

Para Western blotting foi feito o processo de fracionamento de membranas celulares em membrana plasmática (PM) e microssomal (M), para tecido muscular esquelético (Sóleo e EDL). Para isso os tecidos musculares foram homogeneizados em tampão TRIS HCl 10mM; EDTA 1mM, sacarose 250mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) e centrifugados a 1700 rpm durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado

ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1700 rpm) por 10 minutos a 4°C. Os dois sobrenadantes juntos foram submetidos a uma centrifugação a 16000 rpm durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento, correspondendo à fração plasmática (PM), foi ressuspenso em 500 µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização. O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação (47000 rpm) durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento, correspondente à fração microssomal (M), foi ressuspenso em 300 µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização.

A concentração de proteína total das diferentes frações de membranas celulares foi avaliada através do método de Lowry (LOWRY, 1951).

2.10.2. Western Blotting – Quantificação do conteúdo de proteína GLUT4

A detecção das quantidades de proteínas GLUT4 nos músculos Sóleo e EDL foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, com a utilização de kit de quimioluminescência (ECL) para detecção das bandas.

Quantidades iguais de proteínas serão solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio com leite desnatado em pó durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT4 (Chemicon) (diluição 1: 3000 em PBS/BSA 8%), durante 3 horas a 37°C. Posteriormente foi feita uma incubação com os anticorpos secundários anti-IgG, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1: 10000, em solução bloqueadora BSA 1% durante 1 hora. As membranas

foram lavadas vigorosamente com tampão PBS + Triton e colocadas em contato com 4 ml da combinação da solução A e solução B (Solução A: 8,856 ml de água destilada, 100 µl de Luminol 2,5 mM e 44 µl de Ácido Cumárico 400mM e 1 ml de Tris 1M pH 8,5; Solução B: 8,9939 água destilada, 6,1 µl de Peróxido de Hidrogênio e 1 ml de Tris 1M pH 8,5) por 1 minuto e expostas a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1 hora a -70°C para detecção das bandas resultantes. As imagens obtidas após revelação foram analisadas por densitometria óptica, utilizando-se um “software” (IMAGE MASTER ID – AMERSHAM Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

O anticorpo anti-GLUT4 utilizado consistiu em antisoro comercial de coelho (Chemicon International, Temecula, Califórnia).

2.11. Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o método estatístico descritivo, com os resultados apresentados como média \pm EPM. A avaliação estatística dos resultados foi feita através da comparação das médias, utilizando o Teste ANOVA, paramétrico. O teste de Bonferroni foi utilizado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de *P* for menor que 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil Morfométrico

A Tabela 2 abaixo apresenta o perfil morfométrico dos animais no dia do sacrifício. Pode-se observar diferença significativa entre peso corpóreo, tecido adiposo periepididimal e Índice de Lee entre os grupos sedentários e obesos.

Tabela 2 – Perfil Morfométrico dos animais dos grupos: Controle Sedentário (CS), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS) e Obeso Exercício (OE).

Grupo	Peso Corpóreo (g)	Peso T. A. (g)	Índice de Lee
CS	465±14,7	5,2±0,7	29,8±0,4
CE	434±11,3	4±1	29,4±0,3
OS	528±24** #	9,8±3,5# **	30,6±0,5* #
OE	499±16,3*	8,9±4,1* ##	30,6±0,8**

Para o Peso Corpóreo: ** $P < 0,001$ vs CE; # $P < 0,05$ vs CS; * $P < 0,05$ vs CE; para o Tecido Adiposo Periepididimal (T. A.): * $P < 0,05$ vs CS; ** $P < 0,001$ vs CE; # $P < 0,01$ vs CS; ## $P < 0,01$ vs CE; para o Índice de Lee: * $P < 0,05$ vs CS; # $P < 0,001$ vs CE; ** $P < 0,01$ vs CE. N = 10.

3.2. Evolução do peso corpóreo

Os animais foram pesados semanalmente e a imagem a seguir mostra a evolução do peso corpóreo semana após semana mostrando que os animais obesos são considerados significativamente mais pesados do que os animais controles a partir da segunda semana de dieta (Figura 2).

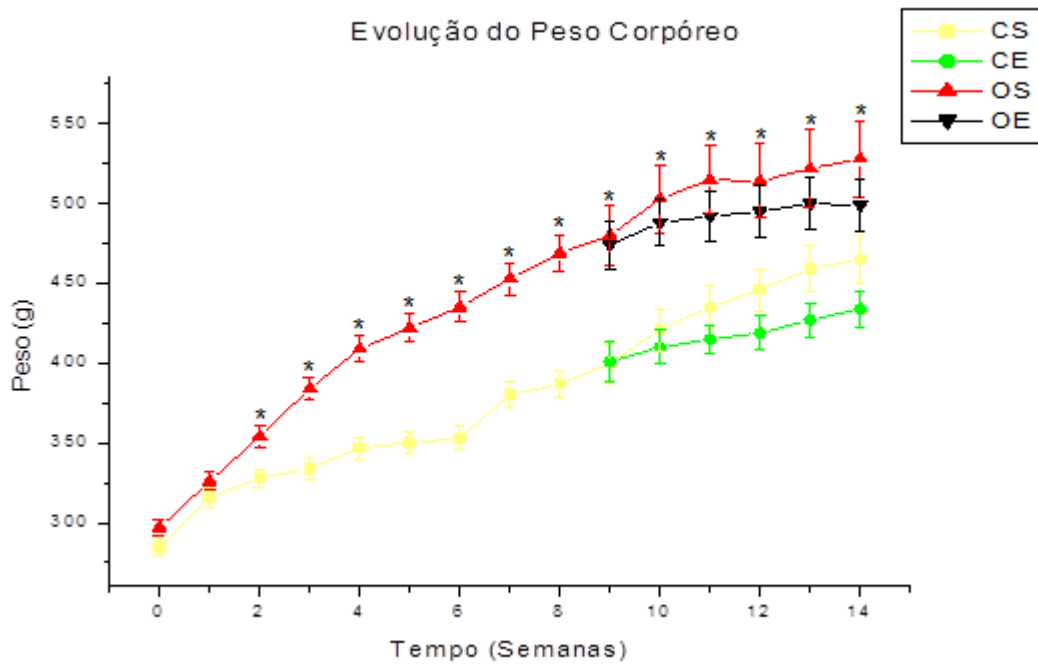


Figura 2 – Evolução do peso corpóreo dos animais. Peso na segunda semana: * $P < 0,05$ vs CS e CE. N = 10.

Na Figura 3 são apresentadas as imagens dos animais para melhor visualização da alteração de peso corpóreo após a imposição da dieta.

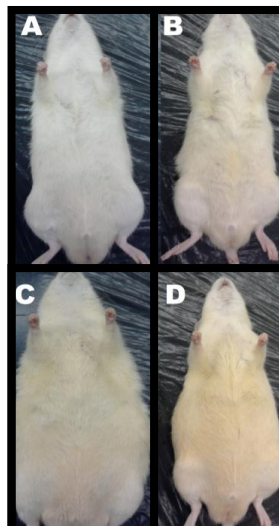


Figura 3 – Em “A” animal do grupo Controle Sedentário; em “B” animal do grupo Controle Exercício; em “C” animal do grupo Obeso Sedentário; em “D” animal do grupo Obeso Exercício.

3.3. Controle de ingestão

A quantidade de ração e dieta ofertada aos animais foi controlada diariamente para se obter o consumo alimentar em gramas e posteriormente estes valores foram convertidos em Kcal. Podemos observar que a ingestão em gramas dos animais foi similar entre os grupos, porém, quando estes valores são transformados em Kcal, o consumo calórico dos animais obesos é superior aos controles (Tabela 3).

Tabela 3 – Controle de ingestão alimentar

Semanas	Controle		Obeso		Δ controle e obeso	
	Ingestão (g)	Ingestão (kcal)	Ingestão (g)	Ingestão (kcal)*	Δ Ingestão (g)	Δ Ingestão (kcal)
1	164,45	493,35	173,8	701,59	-9,35	-208,24
2	122,1	366,3	150,8	665,65	-28,7	-299,35
3	146,55	439,65	175,85	698,21	-29,3	-258,56
4	176,9	530,7	146	643,45	30,9	-112,75
5	135,45	406,35	177,15	777,56	-41,7	-371,21
6	229,85	689,55	214,9	774,56	14,95	-85,01
7	151,35	454,05	245,7	963,61	-94,35	-509,56*
8	189,75	569,25	178,25	668,93	11,5	-99,68
9	139,8	419,4	153,7	625,96	-13,9	-206,56
10	187,1	561,3	167,5	670,38	19,6	-109,08
11	179,8	539,4	165,9	611,04	13,9	-71,64
12	185,8	557,4	147,6	656,94	38,2	-99,54
13	208,7	626,1	221,8	852,46	-13,1	-226,36
14	239	717	210,66	1002,86	28,34	-285,86#

* $P < 0,003$ vs Controle (valor correspondente ao período: 1ª – 7ª semana em Kcal).

$P < 0,002$ vs Controle (valor correspondente ao período: 8ª – 14ª semana em Kcal). N = 10.

3.4. kITT

O teste de tolerância à insulina foi realizado em dois momentos, antes do início do treinamento (A) e uma semana antes do sacrifício (B). O comportamento glicídico dos animais foi semelhante em A, como pode ser observado pelo valor da constante de decaimento de glicose calculado após o teste (kITT). Porém, em B os animais do grupo OS apresentaram uma diminuição da sensibilidade à insulina comparado aos demais grupos (Figura 4).

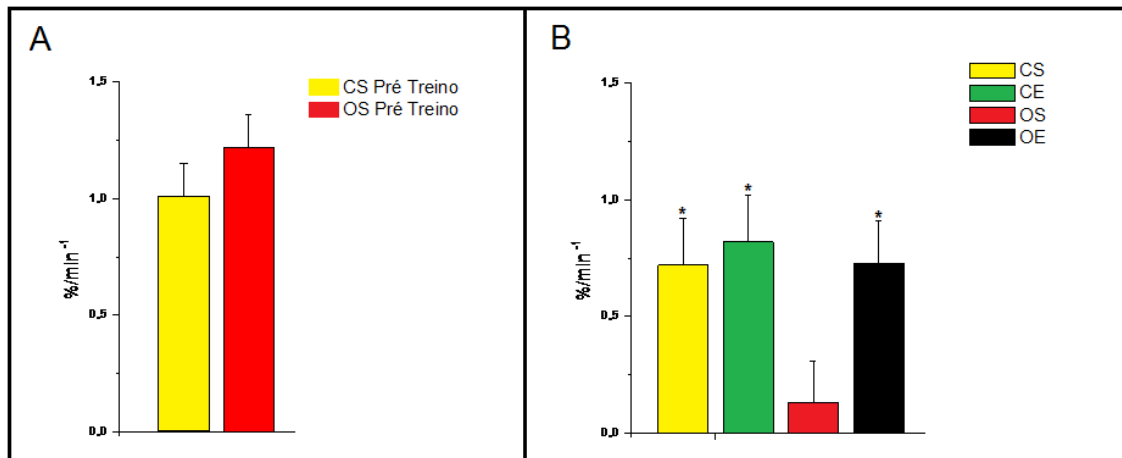


Figura 4 – kITT antes do início do treinamento (A) e uma semana antes do sacrifício (B): * $P < 0,05$ vs OS. N = 10.

3.5. TTG – Teste de tolerância à glicose

Na 8^a e na 14^a semana foi realizado o Teste de Tolerância à Glicose (TTG), no qual foi administrado uma dose de glicose e durante um período de tempo foi acompanhada a ação do hormônio insulina através de coletas de glicemia. Na figura 5, em “A”, a remoção da glicose é melhor no grupo Controle quando comparado ao grupo Obeso (8^a semana). Em “B” (14^a semana), a remoção do grupo OS é pior quando comparado aos grupos CS e OE e tem uma remoção melhor que CE.

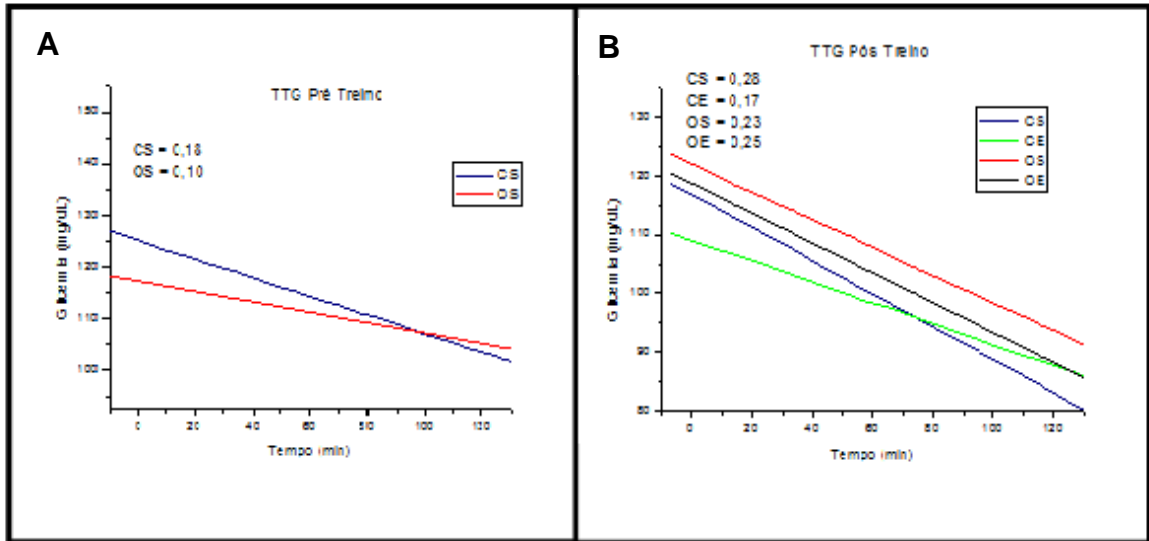


Figura 5 – Teste de Tolerância à Glicose em “A” teste pré treino e em “B” teste pós treino: Controle Sedentário (CS); Controle Exercício (CE); Obeso Sedentário (OS); Obeso Exercício (OE). N = 5.

3.6. Análise Lactacidêmica (após 1ª semana do treino)

Na Figura 6 é apresentada a análise lactacidêmica dos animais exercitados (CE e OE) a fim de verificar o acúmulo de lactato durante o protocolo de exercício. Pode – se observar que de acordo com a sobreposição das séries, a produção de lactato começa a ser superior à remoção e a partir daí começa a existir o acúmulo deste metabólito (predomínio da via glicolítica láctica). Porém, durante o exercício aeróbio contínuo, que tem predomínio da via oxidativa, começa a haver uma tendência à remoção deste produto e durante todo o treino os dois grupos se comportam de maneira semelhante.

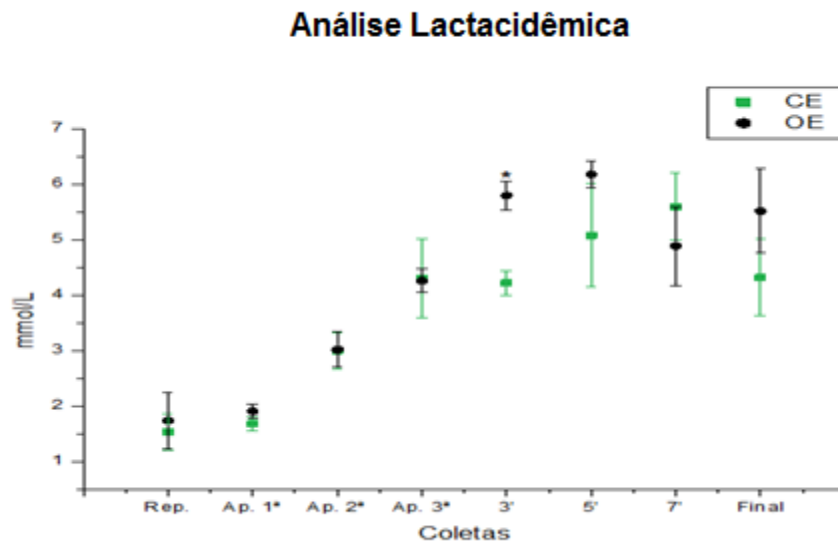


Figura 6 – Concentrações de lactato nos momentos: Repouso, antes da 1ª série, antes da 2ª série, antes da 3ª série, 3' corrida, 5' corrida, 7' corrida e final do treino. Concentração de lactato no momento 3' corrida: * $P < 0,05$ vs OE. N = 5

3.7. Análise Histológica

Foi retirada a porção medial do músculo gastrocnêmio e foram feitas as lâminas que posteriormente foram coradas com Azul de Toluidina para a avaliação da área da secção transversa das fibras. O exercício foi eficiente para aumentar a secção transversa do músculo dos animais treinados (CE e OE) quando comparados com os animais controle sedentário. Porém os animais do grupo OS também apresentaram maior hipertrofia que os animais controle (CS e CE) (figura 7).

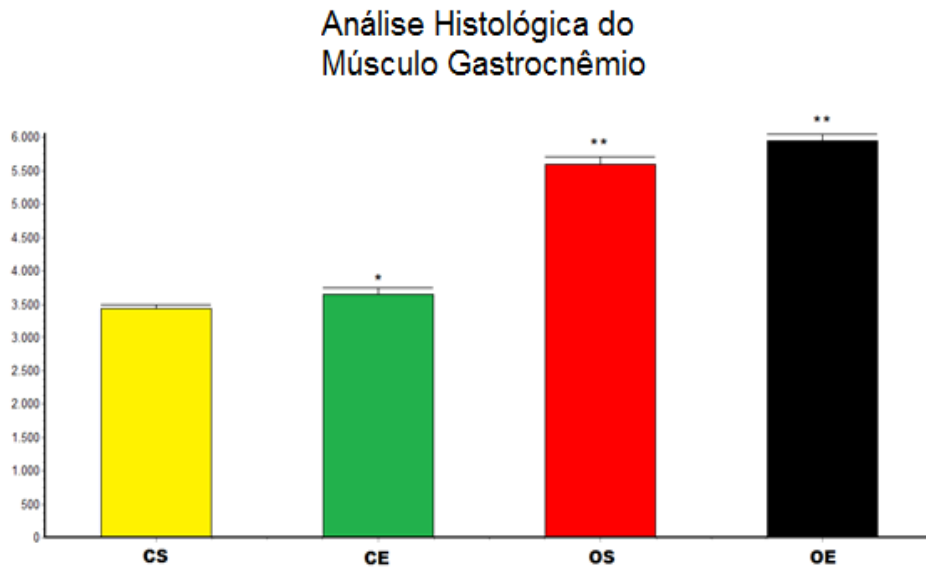


Figura 7 – Análise Histológica músculo Gastrocnêmio. * vs CS $P < 0,05$; ** vs CS e CE $P < 0,01$. N = 200 fibras.

3.8. PCR GLUT4, SOCS3, CKM e GAPDH

Na figura 8 temos a expressão gênica do GLUT4 expressa em UAx100. Em “A” temos a musculatura oxidativa (Sóleo) e em “B” a musculatura glicolítica (EDL). No músculo Sóleo a expressão gênica do GLUT4 não foram encontradas diferenças significativas. No músculo EDL este aumento só existiu no grupo CE quando comparado com CS.

Na figura 9 temos a expressão gênica de CKm expressa em UAx100. Em “A” temos a musculatura vermelha (Sóleo) e em “B” a musculatura branca (EDL). No músculo glicolítico não foram encontradas diferenças entre os grupos. Porém, na musculatura oxidativa os animais do grupo OE tiveram a expressão de CKm significativamente superior aos animais do grupo OS.

Na figura 10 foi analisada a expressão gênica de SOCS3 expressa em

UAx100. Em “A” temos a musculatura Solear e em “B” o músculo Extensor Longo dos Dígito. No músculo Sóleo houve comportamento semelhante entre os grupos, da mesma forma aconteceu na musculatura glicolítica.

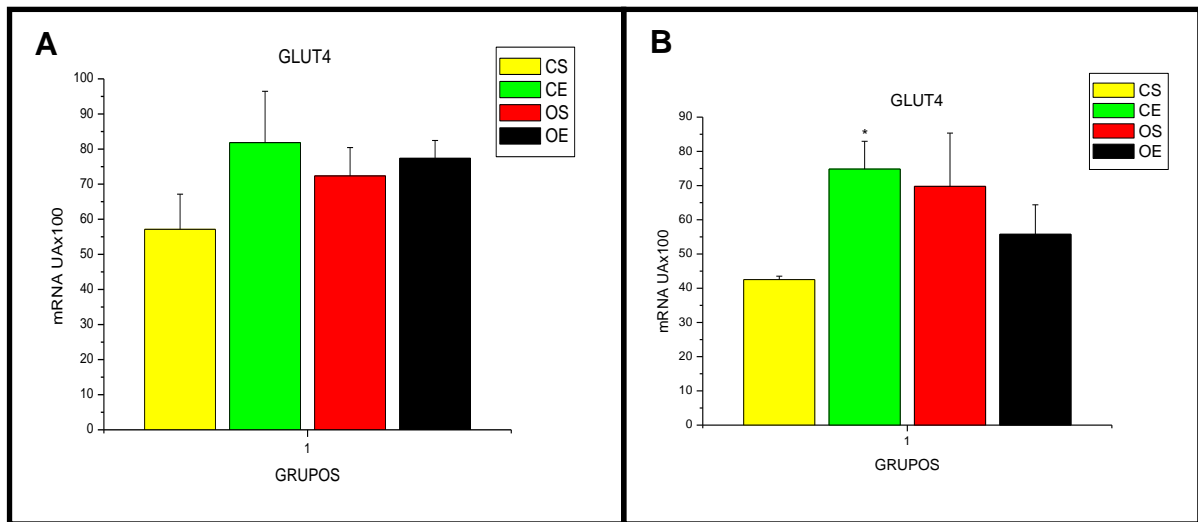
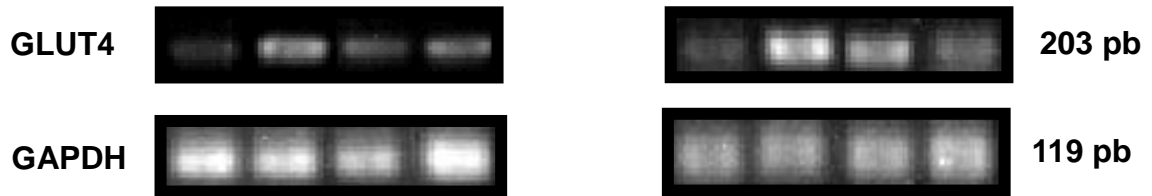


Figura 8 – Conteúdo de RNAm de GLUT4 corrigidos pelo GAPDH e expressos em unidades arbitrárias (UA x 100). Em “A” conteúdo de RNAm da musculatura oxidativa (Sóleo) e em “B” conteúdo de RNAm da musculatura glicolítica (EDL). * $P < 0,05$ vs CS. N = 4 – 5.

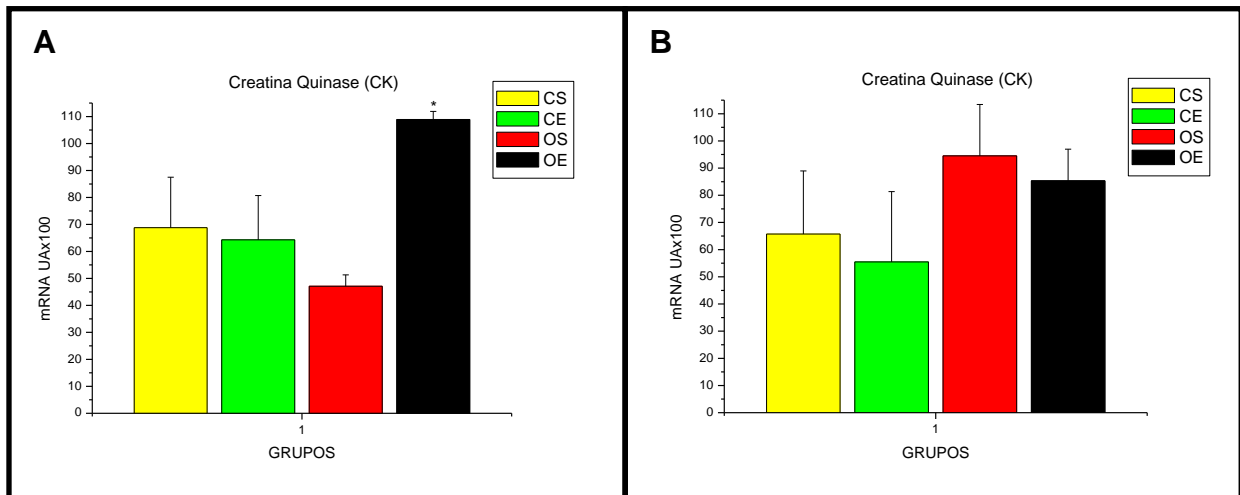


Figura 9 – Conteúdo de RNAm de CKM corrigidos pelo GAPDH e expressos em unidades arbitrárias (UA x 100). Em “A” conteúdo de RNAm da musculatura oxidativa (Sóleo) e em “B” conteúdo de RNAm da musculatura glicolítica (EDL). * $P < 0,05$ vs OS. N = 4 – 5.

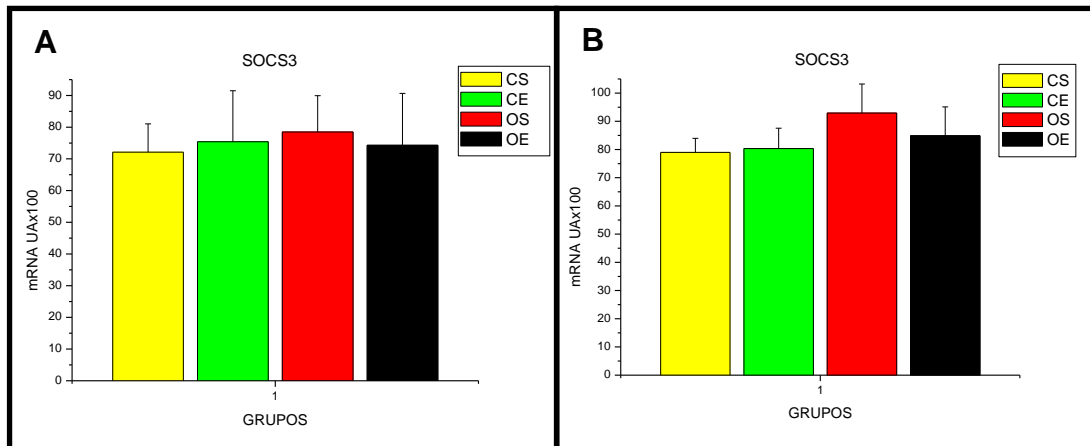
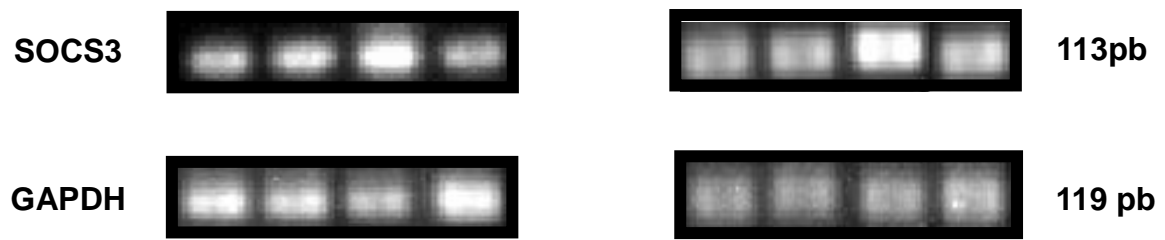


Figura 10 – Conteúdo de RNAm de SOCS3 corrigidos pelo GAPDH e expressos em unidades arbitrárias (UA x 100). Em “A” conteúdo de RNAm da musculatura oxidativa (Sóleo) e em “B” conteúdo de RNAm da musculatura glicolítica (EDL). N = 5 – 7.

3.9. Western Blotting IRS – 1

Para a avaliação do grau de fosforilação do IRS, foi realizado um ensaio de Western Blotting – ECL para a quantificação da fosforilação em tirosina da pp185 do IRS – 1. Também foi realizado um ensaio de immunoblotting para avaliar a fosforilação do Substrato 1 do Receptor de Insulina em Serina³⁰⁷ (via inibitória).

3.9.1. Fosforilação em Serina³⁰⁷

A Figura 11 apresenta resultados da via inibitória da sinalização insulínica através da fosforilação de IRS em Ser³⁰⁷. Em “A” o músculo Sóleo e em “B” o músculo EDL. Na musculatura oxidativa os animais exercitados apresentaram um discreto déficit na fosforilação em resíduos de Serina³⁰⁷ quando estimulados com insulina, o contrário do que aconteceu com os sedentários que, quando estimulados com o hormônio tiveram uma tendência ao aumento da fosforilação nesta região. Quando analisada a musculatura glicolítica, os grupos CS e OE não apresentaram aumento quando estimulados com insulina, porém, os animais CE e OS tiveram tendência a este aumento. Vale ressaltar que o grupo OS teve um aumento maior após a sinalização do hormônio.

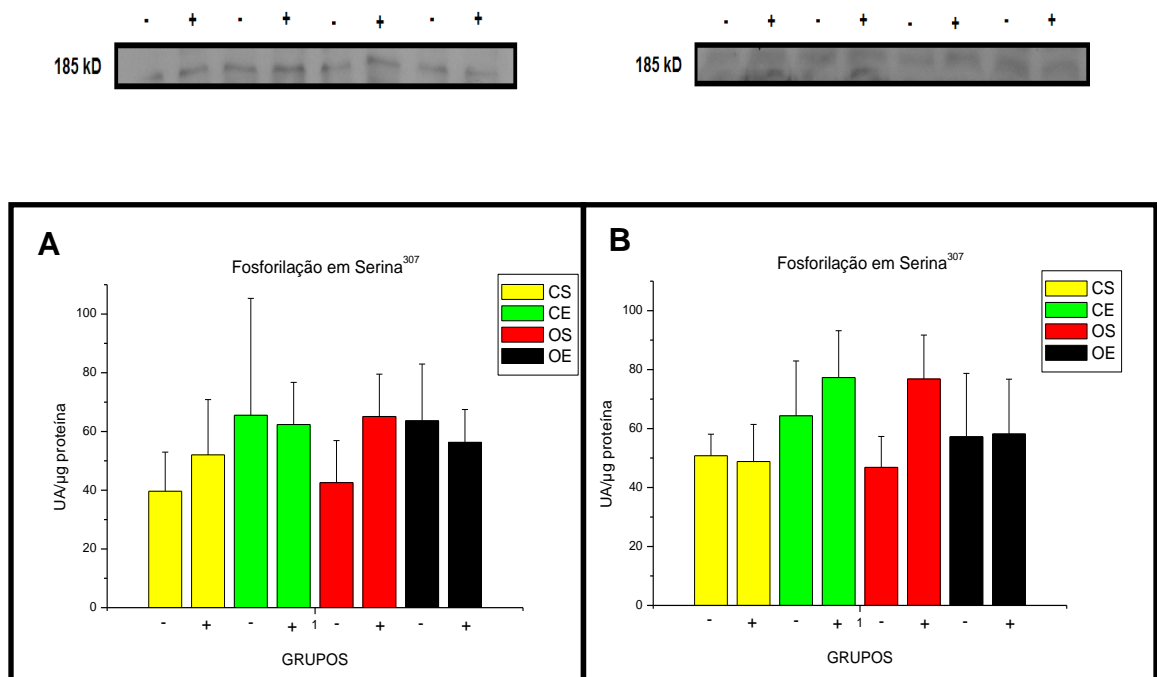


Figura 11 – Grau de fosforilação de IRS – 1 em Serina³⁰⁷, resultados expressos em UA/μg de proteína. Em “A” Sóleo e em “B” Extensor longo dos Dígitos. N = 4.

3.9.2. Fosforilação em Tirosina

A Figura 12 representa a fosforilação da pp 185 em tirosina do IRS – 1 e tem papel importante na ativação de proteínas intracelulares importantes que culminarão na ativação do transportador de glicose 4 para a manutenção da homeostasia glicídica. Em “A” o músculo Sóleo e em “B” o músculo EDL. Na musculatura solear a fosforilação da pp185 em tirosina do IRS – 1 é semelhante entre os grupos. No Extensor Longo dos Dígitos todos os grupos se comportaram da mesma maneira.

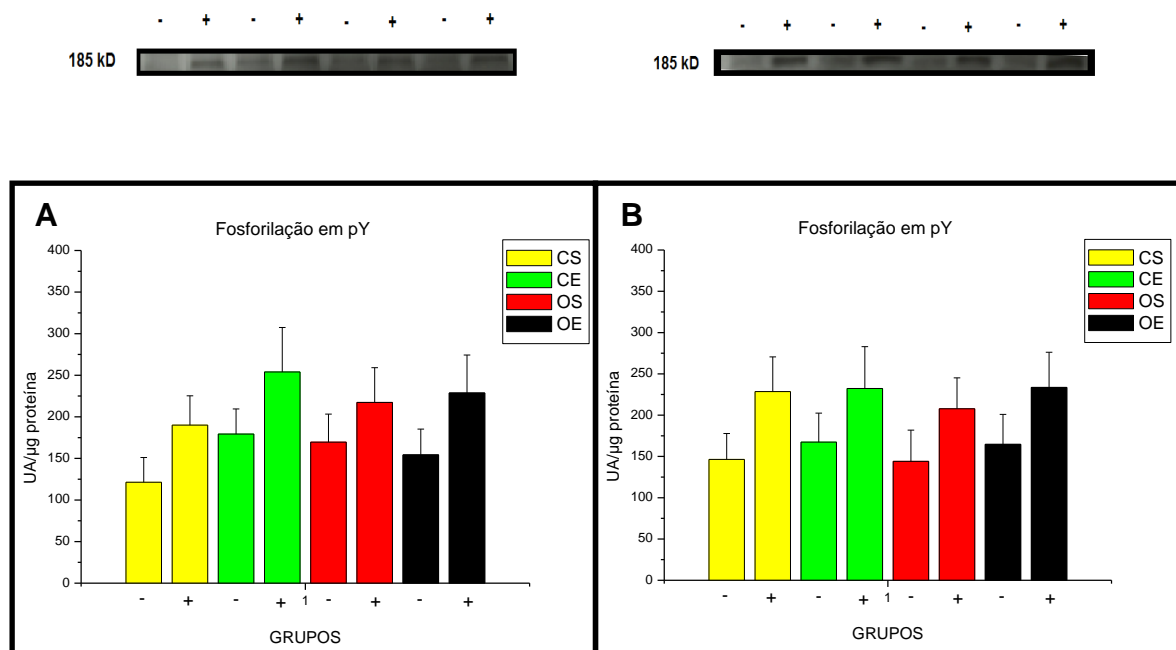


Figura 12 – Fosforilação do IRS – 1 em pY (fosfotirosina). Em “A” a fosforilação da musculatura oxidativa (Sóleo) e em “B” fosforilação da musculatura glicolítica (EDL). N = 4 – 5.

3.10. Quantificação de conteúdo proteico de GLUT4

O conteúdo da proteína GLUT4 foi quantificada pela técnica de Western Blotting – ECL. A figura 13 apresenta os dados da musculatura oxidativa e apenas o grupo OE apresenta diferença significativa no conteúdo de GLUT4 na fração de

membrana microssomal após ser estimulado com insulina quando comparado com a fração microssomal do grupo CS após estímulo insulínico. O grupo OS apresenta um menor conteúdo proteico antes do estímulo, e após a carga de insulina apenas a fração de membrana plasmática sofre uma alteração positiva e o grupo CE tem uma leve diminuição na expressão de GLUT4 após o estímulo de insulina.

A figura 14 apresenta dados da expressão da proteína GLUT4 expressos em UA/ μ g de proteína da musculatura glicolítica. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

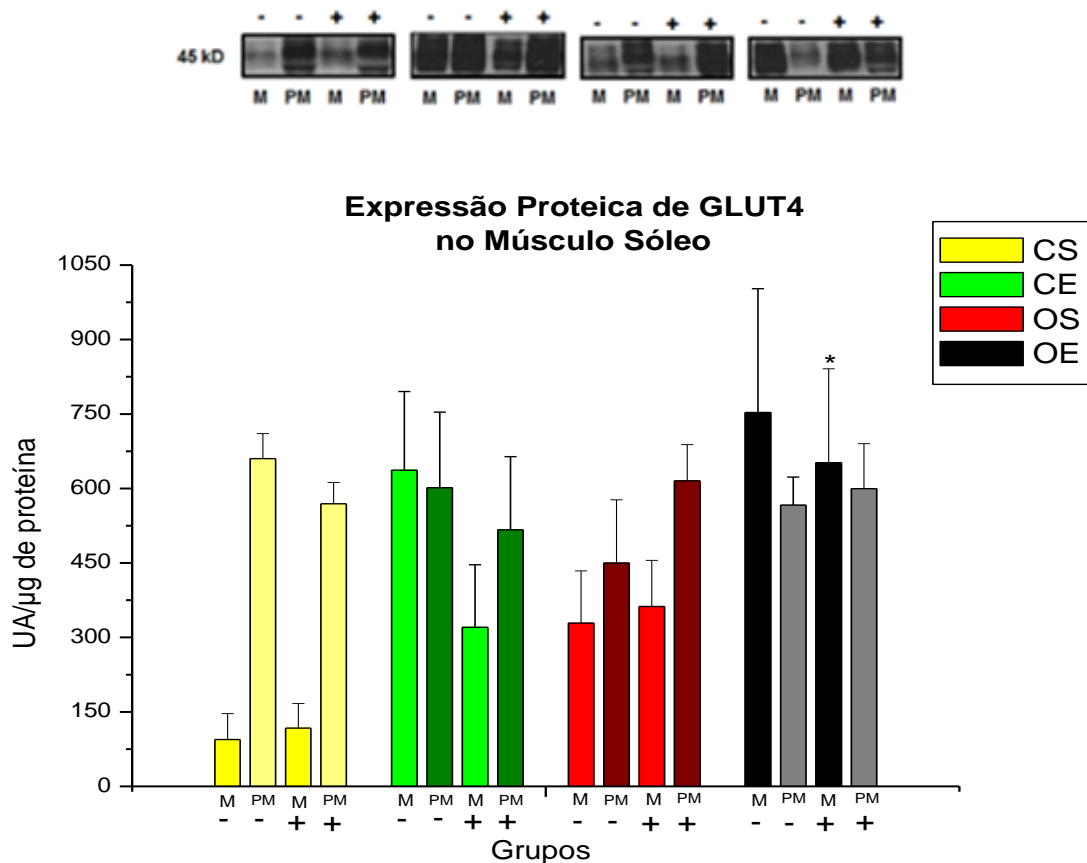


Figura 13 – “Immunoblot”, imagem típica de um ensaio de Western Blotting – ECL. Conteúdo proteico de GLUT4 do músculo Sóleo por meio da técnica de Western Blotting – ECL. * $P < 0,05$ vs CS (M +). N = 4.

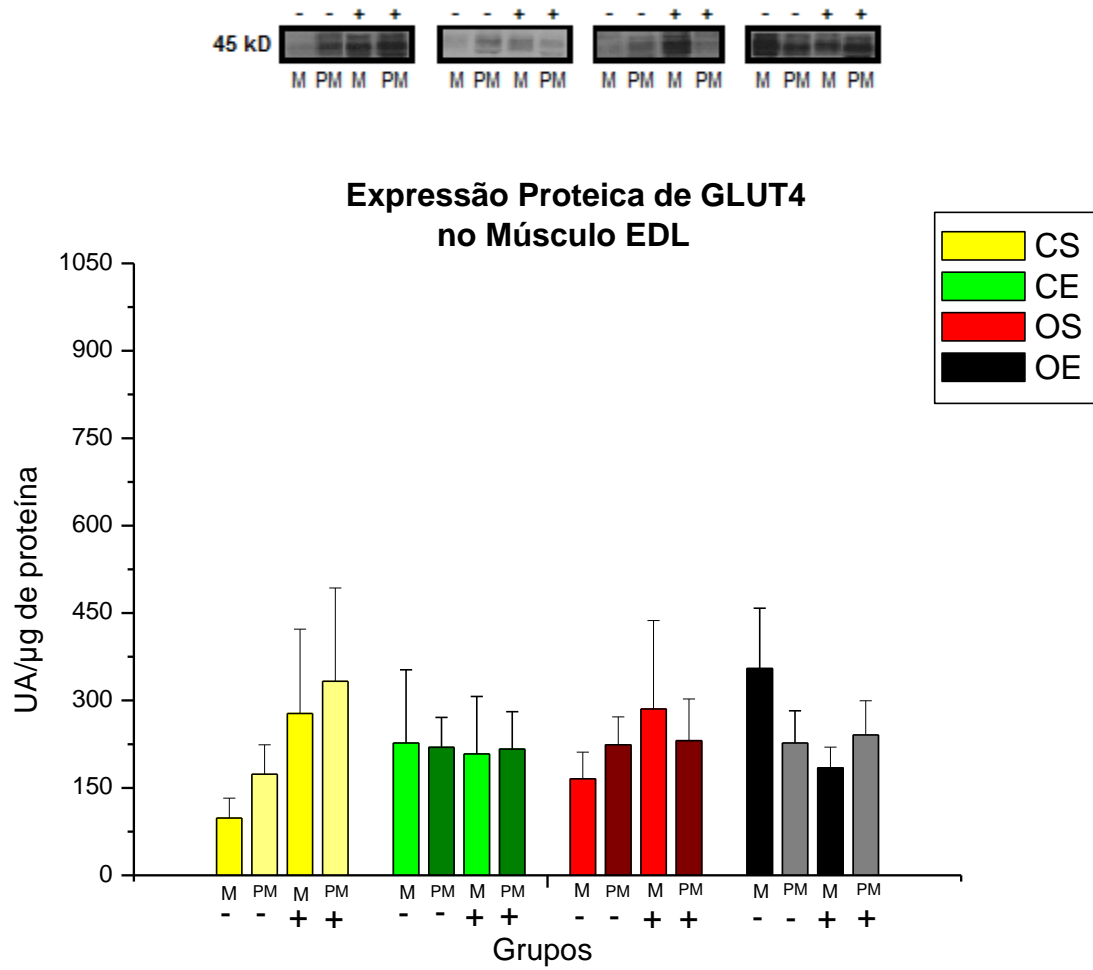


Figura 14 – “Immunoblot”, imagem típica de um ensaio de Western Blotting – ECL. Conteúdo proteico de GLUT4 do músculo EDL por meio da técnica de Western Blotting – ECL. N = 4.

4. DISCUSSÃO

Embora alguns fenômenos ainda não estejam bem elucidados na literatura, muitos malefícios causados pela obesidade já estão bem descritos. É sabido que uma pessoa obesa tem grandes chances de desenvolver patologias relacionadas ao aumento da reserva de gordura, problemas cardiovasculares e resistência hormonal são uma delas (BASTARD *et al.*, 2006).

Como o perfil alimentar da sociedade moderna é rico em ácidos graxos, as pessoas estão cada vez mais obesas (BERTRAND *et al.*, 2011). Por uma questão de praticidade, a população prefere muitas vezes comer um alimento pré – preparado a um alimento que leva um tempo maior para ser preparado, o problema é que estes alimentos possuem características diferentes, na maioria das vezes o primeiro tem uma quantidade maior de ácidos graxos que o segundo. PAN e colaboradores desenvolveram três estudos de coorte (300 mil pessoas) e mostraram que pessoas que consomem carne vermelha tem maior propensão a desenvolver o DM2 e que alimentos processados como salsicha, mortadela e bacon, por exemplo, contribuem em 51% para o aparecimento desta patologia principalmente pela alta quantidade de gordura saturada, sódio e nitritos. Eles acreditam que este último (que é uma espécie de conservante) pode ser transformado em nitrosamina no organismo, e este composto pode ser tóxico para as células B pancreáticas aumentando assim o risco do Diabetes Mellitus tipo 2 (PAN *et al.*, 2011).

Neste estudo, ratos Wistar alimentados com dieta ocidental apresentaram aumento de 13% no peso corporal e de 88% na massa de tecido adiposo periepididimal quando comparados com os animais controle. O índice de Lee também acompanhou estes resultados, pois se encontrou aumentado nos animais

obesos e os animais obesos exercitados apresentaram discreto declínio destes quesitos. Podemos observar claramente tanto o efeito da dieta quanto o efeito do treinamento na Figura 2. Este gráfico apresenta a evolução do peso corpóreo dos animais semana a semana. A diferença entre os animais obesos e controles começa a aparecer a partir da 2ª semana e segue até o final do estudo. Podemos ver também o efeito do exercício, pois os animais exercitados apresentam uma evolução de peso semanal bem mais baixa do que os sedentários, o que pode ser calculada conforme a fórmula: $\Delta\% = \{[(\text{Massa Final} - \text{Massa } 1^{\text{a}} \text{ semana de treino} / 1^{\text{a}} \text{ semana de treino}) \times 100] / 6 \text{ semanas}\}$ (BERNARDES, 2004). Podemos observar que, por semana, os animais do grupo CS apresentam uma evolução no peso de 2,6%, CE de 1,3%, OS 1,6% e OE 0,8%. Com isso podemos ver que, embora os animais estejam obesos, o exercício se mostrou eficiente para atenuar os efeitos causados pela dieta hiperlipídica, provavelmente através do aumento da oxidação de ácidos graxos, em relação ao peso corporal dos animais conforme já discutido em alguns estudos da literatura (PANVELOSKI COSTA *et al.*, 2011).

A ingestão alimentar em gramas não é diferente entre os grupos, porém quando estes valores são convertidos em Kcal, os animais obesos têm uma ingestão calórica significativamente superior aos animais controle, fazendo com que os animais optem pela dieta ocidental ao invés da ração padrão, a qual também era ofertada a estes animais.

Já está bem estabelecido que o quadro de resistência insulínica têm uma relação muito estreita com um estado inflamatório crônico subclínico, e esta disfunção metabólica, caracterizada pelas altas concentrações de citocinas pró – inflamatórias, causa um aumento da ativação de proteínas intracelulares capazes de modular negativamente o sinal dado pela insulina, diminuindo assim a ativação do

transportador de glicose 4, culminando numa menor captação de glicose plasmática (ARKAN *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2005; TATARANNI e ORTEGA, 2005).

Quando avaliado o KITT, vemos que antes do treinamento os animais não apresentaram diferenças significantes, pois provavelmente nesta etapa o quadro de obesidade ainda não estava bem instalado e vale ressaltar que o tecido adiposo também é um órgão sensível à ação da insulina, portanto também contribui para a captação da glicose sérica. Além disso, uma maior captação de glicose no período de instalação da obesidade é fator crucial para aumentar estoque de triglicerídeos no tecido adiposo nos obesos. Porém, quando o teste foi realizado ao final do estudo, observamos que os animais obesos apresentam uma resposta alterada à sinalização do hormônio insulina. Em compensação os animais obesos que treinam apresentam maior sensibilidade ao hormônio do que os animais OS, mostrando que o exercício físico combinado pode melhorar a sensibilidade insulínica, até mesmo de indivíduos que já são resistentes ao hormônio.

No teste de tolerância à glicose, na 8ª semana (Pré Treino), os animais controle tinham uma taxa de remoção de glicose melhor que dos animais obesos (0,18 e 0,10 %/minuto⁻¹ respectivamente). Na última semana o teste foi feito também, e os animais obesos que treinaram, apresentaram um discreto aumento na taxa de remoção da glicose quando comparados com os animais obesos que não treinaram. Os animais do grupo Controle Exercício apresentam uma taxa de remoção menor que os outros grupos, porém a glicemia destes animais antes do início do teste (tempo 0) é menor que os outros grupos e mesmo tendo um coeficiente angular menor que todos os grupos (0,17 para CE e 0,28; 0,23; 0,25 para CS, OS e OE respectivamente) apresenta uma glicemia pós teste igual à CS e OE. O grupo OS teve uma glicemia pós teste discretamente superior aos outros grupos. Neste caso a

insulina produzida pelo pâncreas dos animais está sendo efetiva para manter a homeostasia glicídica, porém não se sabe se o grupo Obeso Sedentário já apresenta um quadro de hiperinsulinemia compensatória, que pode explicar o fato de estes animais apresentarem uma remoção normal de glicose no TTG e durante o TTI se apresentar resistentes, pois se estes animais podem estar liberando uma quantidade de insulina superior ao normal para compensar o quadro de RI que foi apresentado no Teste de Tolerância à Insulina já que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia tem forte correlação (RIZVI, 2010). O que pode explicar a baixa taxa de remoção de glicose dos animais exercitados é o aumento da atividade simpática causada pelos estímulos elétricos. VERAGO e colaboradores mostram que animais que recebem estímulos elétricos nas patas agudamente (3 sessões de choques), após cada uma ocorre o aumento das concentrações de corticosterona e glicose. A hiperglicemia ocorre talvez pela ação da corticosterona sobre o efeito das catecolaminas em conjunto com a ação do glucagon, que estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepática. Estes animais também foram submetidos ao TTG, e estes apresentaram aumento da glicemia após injeção i. v. de glicose, esta hiperglicemia foi superior aos animais controle e esta diferença continua 30 minutos após a dose. As concentrações de insulina, como esperado foram proporcionais às concentrações de glicose plasmática (que foi maior e mais prolongada que os controle), mostrando que a resposta pancreática à glicose se mantém inalterada, porém a captação de glicose periférica está prejudicada (VERAGO *et al.*, 2001; FARIAS – SILVA *et al.*, 2002). Este mecanismo pode envolver o aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelular causando alteração na eficácia do GLUT4 migrar para a membrana plasmática captar glicose (REUSCH *et al.*, 1991; BEGUM *et al.*, 1992; BEGUM *et al.*, 1993; REUSCH *et al.*, 1993).

As concentrações de lactato dos animais atingiram as concentrações entre 5 e 5,5 mmol/L. Teoricamente esses valores não seriam suficientes para afirmar que os animais eram submetidos a um protocolo de exercício anaeróbio, entretanto, estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que no exercício de salto isolado, com recuperação passiva (7 minutos após o término da sessão de treino), os animais acumulavam aproximadamente 7,05 e 7,64 mmol/L (controle e obeso respectivamente) (PANVELOSKI – COSTA *et al.*, *in press*). Como no protocolo descrito neste estudo, após o treino de salto, os animais fazem exercício aeróbio contínuo com predomínio da via metabólica dos ácidos graxos, e isto está bem descrito na literatura como acelerador da remoção de ácido láctico da corrente sanguínea e na literatura, como o valor descrito como limiar anaeróbio de animais é inferior a 7 mmol/L (GOBATTO *et al.*, 2010), podemos inferir que o exercício de salto realizado no presente estudo possui maior participação do metabolismo glicolítico durante o protocolo de exercício (VOLTARELLI, 2004).

Na Figura 7 fica claro o aumento da secção transversa do músculo gastrocnêmio dos animais que treinam, pois são relativamente superiores aos animais sedentários. Um dado curioso é que os animais OS apresentaram um maior diâmetro de fibras do que os animais controle. Isto pode ser justificado pelo fato destes animais apresentarem um peso mais elevado do que animais controles, o que pode ser considerado como sobrecarga para os membros inferiores, contribuindo para apresentação de uma maior secção transversal.

Uma das vias estimuladas pela sinalização de citocinas pró – inflamatórias é a via das serinas/treoninas quinases (IKK β e JNK) que a partir do momento em que se tornam ativas, aumentam a fosforilação da subunidade catalítica do receptor de insulina (β) e do IRS – 1 em resíduos de serina, diminuindo assim o sinal insulínico e

consequentemente uma menor ativação de proteínas chave da cascata de sinalização da insulina e contribuindo para uma menor captação de glicose (HIROSUMI *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2001; PRADA *et al.*, 2005). Em modelos experimentais recentes foi demonstrado que o estresse de retículo endoplasmático e espécies reativas de oxigênio, têm participação na ativação destas serinas/treoninas quinases (FURUKAWA *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2005; NAKATANI *et al.*, 2005). Algumas citocinas (IL – 6 e TNF – α por exemplo) atuam classicamente através da ligação em seus receptores (SHOELSON *et al.*, 2006), porém outras vias podem também ativar estas serinas/treoninas quinases, como a via dos Toll Like Receptors (TLRs) (AKIRA *et al.*, 2006). Alguns conjugados lipídicos, como os Lipopolissacarídeos (LPS), ligam-se facilmente a esses receptores e ativam IKK β e JNK, e como estes conjugados lipídicos são muito expressos em dietas hiperlipídicas, acredita – se que em populações obesas a ativação destes receptores por meio de LPS é maior e que há forte relação entre ativação de TLRs, resistência insulínica e obesidade (LEE *et al.*, 2001).

Quando analisada a expressão gênica de GLUT4, CKm e SOCS3, apenas na musculatura glicolítica se observou aumento da expressão de GLUT4 nos controles exercitados, o que está de acordo com o pressuposto de que o treinamento imposto tem mais caráter glicolítico e menos oxidativo. O aumento de expressão de CKm na musculatura oxidativa do grupo obeso exercício pode ser justificada pelo tipo de treinamento imposto, durante o qual esteja predominando a via anaeróbia aláctica. Inesperadamente, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de SOCS3, apenas um discreto aumento na musculatura glicolítica do grupo obeso sedentário, que pode ser justificada pelo tipo de alimentação e/ou hábito sedentário, sugerindo, portanto, discreto grau de inflamação neste grupo.

Quando analisadas a fosforilação em Serina³⁰⁷ do IRS – 1, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Quando avaliamos a fosforilação em tirosina da pp185 do IRS – 1, encontramos um comportamento semelhante entre os grupos. Como mostra o kITT os animais OS apresentam resistência ao hormônio insulina, mas provavelmente o problema não ocorre nas etapas iniciais da sinalização e, sim, em alguma outra proteína chave por ativar o GLUT4, como a regulação negativa da fosforilação da AKT. YUNG *et al.* mostraram que o estresse de retículo modula a especificidade dos substratos fosforilados da AKT, pela supressão de sua fosforilação, prejudicando assim o transporte da glicose (YUNG *et al.*, 2011).

A literatura mostra que a musculatura oxidativa tem maior participação na captação de glicose no organismo como um todo, e, portanto, a expressão de GLUT4 é maior na musculatura Solear do que no Extensor Longo dos Dígito. Quando comparamos a expressão protéica no músculo Sóleo, apenas o grupo OE apresentou maior expressão de GLUT4 na membrana microssomal que os animais controle sedentários quando estimulados com insulina e o grupo OS apresenta uma tendência a ter uma expressão menor de transportador de glicose tanto na fração de membrana microssomal quanto na fração de membrana plasmática, corroborando com os dados encontrados no presente estudo (kITT, TTG).

Na musculatura glicolítica a expressão protéica do GLUT4 não é diferente entre os grupos. Esses dados mostram que o grupo Obeso Sedentário pode apresentar alguma deficiência na cascata de sinalização da insulina, porém as variáveis analisadas não são suficientes para inferir qual proteína está prejudicando este sinal. Como já é sabido, são várias as proteínas envolvidas na maquinaria de ativação do GLUT4 (PI3 – K, AKT, PKC α , PKC δ , e m-TOR) (ZICK, 2003) e além das proteínas,

fatores transcricionais podem induzir a regulação deste gene e seus mecanismos podem ser ativados de forma distinta. Estudos mostram que a inativação do NFκ – B causa aumento da expressão gênica de GLUT4. E este aumento também ocorre em resposta à atividade contrátil, por ativação dos MEF2A, MEF2D, GEF e HIF – 1a, estimuladores do gene GLUT4 (SILVA *et al.*, 2005). E como estes fatores não foram quantificados neste estudo, existe a hipótese de algum ou alguns desses fatores estarem interferindo na cascata de sinalização da insulina direta ou indiretamente modulando negativamente a ativação do transportador de glicose 4, diminuindo assim a captação da glicose sanguínea e prejudicando assim a homeostasia glicídica.

5. CONCLUSÕES

Podemos concluir com estes resultados que a dieta ocidental foi eficiente para gerar um estado metabólico de obesidade e que os indivíduos que consomem esta dieta estão propensos a serem obesos e resistentes insulínicos. Quando temos a opção de escolher o tipo de alimento, preferimos os mais palatáveis aos menos palatáveis, agravando ainda mais o quadro de obesidade. E o treinamento combinado parece diminuir os efeitos negativos deste tipo de alimentação causando uma melhora, mesmo que discreta em alguns fatores, como tolerância à glicose, expressão de RNAm de GLUT4 e SOCS3, fosforilação em Serina³⁰⁷ e em Tirosina da pp185 do IRS – 1 e expressão proteica de GLUT4. Estes dados mostram que o exercício físico em conjunto com uma boa alimentação, podem ser ferramentas importantes tanto na prevenção quanto na intervenção da obesidade.

6. REFERÊNCIAS

1. AKIRA, S., *et al.* **Pathogen recognition and innate immunity.** Cell. 124: 783 – 801. 2006.
2. ALESSI, D. R.; COHEN, P. **Mechanism of activation and function of protein kinase B.** Curr. Opin. Genet. Dev. 1: 55 – 62. 1998.
3. ARKAN, M. C., *et al.* **IKK – beta links inflammation to obesity – induced insulin resistance.** Nat. Med. 11: 191 – 98. 2005.
4. BACKER, J. M. *et al.* **Phosphatidylinositol 3' – kinase is activated by association with IRS – 1 during insulin stimulation.** Embo. J. 9: 3469 – 79. 1992.
5. BAHIA, L. R. *et al.* **The costs of type 2 Diabetes Mellitus outpatient care in the brazilian public health system.** Value Health. 14 (5 Suppl. 1): 5137 – 40. 2011.
6. BARAUNA, V. G. *et al.* **Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 32: 249 – 54. 2005.
7. BASTARD, J. P., *et al.* **Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance.** Eur Cytokine Netw. 17 (1): 4 – 12. 2006.
8. BEGUM, N., *et al.* **Calcium – induced inhibition of phosphoserine phosphatase in insulin target cells is mediated by the phosphorylation and activation of inhibitor1.** J. Biol. Chem. 267: 5959 – 63. 1992.

9. BEGUM, N. *et al.* **GLUT4 phosphorylation and its intrinsic activity. Mechanism of Ca (2+) induced inhibition of insulin stimulated glucose transport.** J. Biol. Chem. 268: 3352 – 6. 1993.
10. BERNARDES, D. *et al.* **Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos.** Revista Brasileira de educação física esp. 18 (2): 191 – 200. 2004.
11. BERTRAND, R. L., *et al.* **A western diet Increases Serotonin availability in rat small intestine.** Endocrinology. 152(1): 36 – 47. 2011.
12. BRIAN, B. R., *et al.* **Phosphocreatine kinetics at the onset of contractions in skeletal muscle of MM creatine kinase knock – out mice.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283: C1776 – C1783. 2002.
13. CAI, D., *et al.* **Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK – beta and NF – kappaB.** Nat. Med. 11: 183 – 90. 2005.
14. CARVALHO, M. *et al.* **Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina.** Arq Bras Endocrinol Metab. 50 (2). 2006.
15. COSTA, A. C. P., *et al.* **Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet.** Arq Bras Endocrinol Metab. 55 (2): 155 – 63. 2011.
16. DÂMASO, A. (Coord). **Obesidade.** 1ª. ed. São Paulo: Medsi, 2003.
17. DANDONA, P., *et al.* **Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.** Trends Immunol. 25: 4 – 7. 2004.
18. DUARTE, A. C. G. O., *et al.* **Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos.** Rev. Nutr. 19 (3): 341 – 8. 2006.

19. FARIAS – SILVA, E., *et al.* **Insulin subsensitivity following footshocked stress.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 80 (8): 783 – 9. 2002.
20. FURUKAWA, S., *et al.* **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *J. Clin. Invest.* 114: 1752 – 61. 2004.
21. GOBATTO, F. B. M., *et al.* **Limiar anaeróbico em corrida e natação para ratos: determinação utilizando dois métodos matemáticos.** *Revista da Educação Física/UEM.* 21 (2): 245 – 53, 2010.
22. GREENHILL, C. J., *et al.* **IL – 6 signaling modulates TLR – 4 dependent inflammatory responses via STAT3.** *J. Immunol.* 186 (2):1199 – 208. 2011.
23. HIROSUMI, J., *et al.* **A central role for JNK in obesity and insulin resistance.** *Nature.* 420: 333 – 6. 2002.
24. HOTAMISLIGIL, G. S., *et al.* **Adipose expression of tumor necrosis factor – alpha: direct role in obesity – linked insulin resistance.** *Science.* 259: 87 – 91. 1993.
25. HOTAMISLIGIL, G. S., *et al.* **Increased adipose tissue expression of tumor necrosis tumoral – alpha in human obesity and insulin resistance.** *J. Clin. Invest.* 95: 2409 – 15. 1995.
26. HOTAMISLIGIL, G. S. **Role of endoplasmic reticulum stress and c – Jun NH2 – terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes.** *Diabetes.* 54 (2): s73 – s78. 2005.
27. JESSEN, N.; GOODYEAR, L. **Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle.** *J Appl Physiol.* 99: 330 – 7, 2005.
28. KERN, P. A., *et al.* **The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase.** *J. Clin. Invest.* 95: 2111 – 9. 1995.

29. LAMAS, O., *et al.* **Energy restriction restores the the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats.** *J Nutr Biochem.* 15 (7): 418 – 25. 2004.
30. LEE, J.; PILCH, P. F. **The insulin receptor: structure, function, and signaling.** *Am. J. Physiol.* 2 (Pt 1): C319 – 34. 1994.
31. LEE, J. Y., *et al.* **Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase – 2 mediated through Toll – like receptor 4.** *J Biol Chem.* 276: 16683 – 9. 2001.
32. LÉGER, B., *et al.* **Human sarcopenia reveals na increase in SOCS – 3 and myostatin and a reduced efficiency of AKT phosphorylation.** *Rejuvenation Res.* 11:163B – 75B. 2008.
33. LIN, Y., *et al.* **The hyperglycemia – induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species.** *J. Biol. Chem.* 280: 4617 – 26. 2005.
34. LOWRY, O. *et al.* **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.,* 193: 265 – 75. 1951.
35. MACHADO, U.F. *et al.* **Transportadores de glicose na síndrome metabólica.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* 50 (2): 2006.
36. MATÍA M. P. *et al.* **Nutrition and metabolic syndrome.** *Rev Esp Salud Publica.* Sep-Oct; 81(5):489-505. 2007.
37. MEIRELLES, C. M.; GOMES, P. S. C. **Efeitos agudos da atividade contra – resistência sobre o gasto energético: Revisando as principais variáveis.** *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 10 (2): 122 – 30. 2004.
38. MOKDAD, A. H., *et al.* **Prevalence of obesity, diabetes, and obesity – related health risk factors, 2001.** *Jama.* 289: 76 – 9. 2003.

39. NAKATANI, Y., *et al.* **Involvement of Endoplasmic Reticulum stress in insulin resistance and diabetes.** The Journal of Biological Chemistry. 280 (1): 847 – 51. 2005.
40. Organização Mundial da Saúde. Sep. 2006. Apresenta informações sobre a taxa de obesidade e sobre peso mundial. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 22 nov. 2011.
41. PAN, A., *et al.* **Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta – analysis.** Am J Clin Nutr. 94: 1 – 9. 2011.
42. PANVELOSKI – COSTA, A. C., *et al.* **Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 55 (2):155 – 163. 2011.
43. PANVELOSKI – COSTA, A. C., *et al.* **Respostas lactacidêmicas de ratos ao treinamento intermitente de alta intensidade.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte. “*in press*”.
44. PRADA, P. O. *et al.* **Western Diet modulates insulin signaling, c – Jun N – Terminal Kinase activity, and Insulin Receptor Substrate – 1^{ser307} Phosphorylation in a Tissue – Specific Fashion.** Endocrinology 146 (3):1576 – 87. 2005.
45. RAVICHANDRAN, K. S., **Signaling via Shc family adapter proteins.** Oncogene. 20: 6322 – 30. 2001.
46. REAVEN, G. M. **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** Diabetes. 37: 1595 – 607. 1988.

47. REUSCH, J. E., *et al.* **Regulation of GLUT4 phosphorylation by intracellular calcium in adipocytes.** *Endocrinology.* 129: 3269 – 73. 1991.
48. REUSCH, J. E., *et al.* **Inverse relationship between GLUT4 phosphorylation and its intrinsic activity.** *J. Biol. Chem.* 268: 3348 – 51. 1993.
49. RIBOT, J. *et al.* **Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats.** *Obesity:* 16 (4): 723 – 30, 2008.
50. RIZVI, A. A. **Hypertension, Obesity and inflammation: The complex designs of a deadly trio.** *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 8 (4): 287 – 94, 2010.
51. SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. **Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** *Nature.* 6865: 799 – 806. 2001.
52. SHOELSON, S. E., *et al.* **Inflammation and insulin resistance.** *J Clin Invest.* 116(7): 1793 – 1801. 2006.
53. SILVA, J. L., *et al.* **NF – kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1a involvement on insulin and contraction induced regulation of GLUT4 gene expression on Soleus muscle.** *Mol Cell Endocrinol.* 240 (1 – 2): 82 – 93. 2005.
54. STENGHEL, M. *et al.* **Síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e obesidade.** *Rev Paul Pediatr.* 25(3):214-20, jul. 2007.
55. TALANIAN, J. L., *et al.* **Two weeks of high – intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women.** *J Appl Physiol.* 102: 1439 – 47. 2007.
56. TAMAKI, T. *et al.* **A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats.** *Med. Sci. Sports Exerc.;* 24:881 – 6. 1992.

57. TATARANNI, P. A.; ORTEGA, E. **A burning question: does and adipokine – induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes?** *Diabetes*. 54: 917 – 27. 2005.
58. UCHIYAMA, S. *et al.* **Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage.** *Eur. J. Physiology*. 452: 109 – 116. 2006.
59. VALERIO, A., **TNF – alpha downregulates iNOS expression. And mitochondrial biogenesis in fat and muscles of obese rodents.** *J Clin Invest*. 116 (10): 2791 – 8. 2006.
60. VERAGO, J. L., *et al.* **Metabolic markers following beta adrenoceptor agonist infusion in footshocked – stress rats.** *Braz. J. Med. Biol. Res. Vol.* 34 (9): 1197 – 1207. 2001.
61. VOLTARELLI, F. A., *et al.* **Glicogênio muscular e limiar anaeróbio determinado em ratos durante a natação.** *Motriz*. 10 (1): 25 – 30, 2004.
62. WHITE, M. F.; KAHN, C. R. **The insulin signaling system.** *J. Biol. Chem.* 1: 1 – 4. 1994.
63. WHITE, M. F. **IRS proteins and the common path to diabetes.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 3: E413 – 22. 2002.
64. YONEMITSU, S. *et al.* **Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes,** *Diabetes* 50:1093 – 101. 2001.
65. YUAN, M., *et al.* **Reversal of obesity and diet – induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of ikkbeta.** *Science*. 293: 1673 – 77. 2001.

- 66.** YUNG, H. W., *et al.* **Regulation of AKT phosphorylation at Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸ by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner.** PLoS ONE. 6 (3): e17894 1 – 12. 2011
- 67.** ZIMMET, P., *et al.* **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** Nature. 6865: 782 – 7. 2001.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa, processo nº79/2009.



Presidente Prudente, 04 de setembro 2009.

Ilmo.(a) Sr.(a)

Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim.

Ref. Projeto intitulado: "Efeito de atividade aeróbica e anaeróbica combinada sobre a sinalização da insulina e transportador de glicose em musculatura esquelética", a ser desenvolvido pelo aluno especial do curso de Pós-graduação em Fisioterapia, Danilo Antônio Corrêa Pinto Júnior, sob orientação da Profa. Dra. **Patrícia Monteiro Seraphim**.


Processo no. 79/2009

Recebemos o seu projeto, o qual foi examinado pelo assessor, tendo recebido o parecer anexo.

Decorrente do exposto, este Comitê, em concordância com o parecerista, considera o projeto **APROVADO**.

Informamos, ainda, que diante do cronograma do desenvolvimento da pesquisa, ficam estabelecidas as datas de 01/04/2011 e 16/01/2012, os prazos para encaminhamento ao CEP de relatórios parcial e final sucinto (vide modelo na página da FCT).

Atenciosamente,



Prof. Dra. Edna Maria do Carmo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCT - Unesp - Presidente Prudente