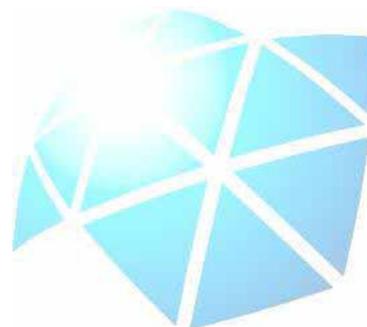


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**“EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANAERÓBIO SOBRE  
A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA  
CAPTAÇÃO DE GLICOSE E VIA PROTEOLÍTICA  
DEPENDENTE DE ATP NO MÚSCULO ESQUELÉTICO  
DE RATOS DIABÉTICOS”**

Rogério de Oliveira Batista

Presidente Prudente  
2014



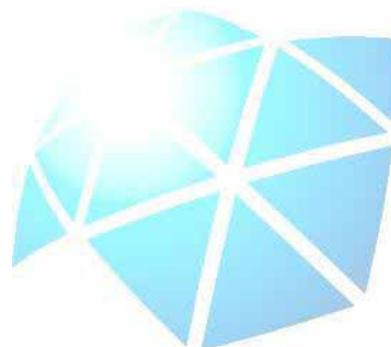
**“EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANAERÓBIO SOBRE  
A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA  
CAPTAÇÃO DE GLICOSE E VIA PROTEOLÍTICA  
DEPENDENTE DE ATP NO MÚSCULO ESQUELÉTICO  
DE RATOS DIABÉTICOS”**

Rogério de Oliveira Batista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP Campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente  
2014



## FICHA CATALOGRÁFICA

B337e Batista, Rogério.  
Efeitos do exercício físico de salto sobre as proteínas relacionadas à captação de glicose e via proteolítica dependente de ATP no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por administração de aloxana / Rogério de Oliveira Batista. - Presidente Prudente : [s.n], 2013  
00 f.

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

1. Diabetes mellitus e treinamento. 2. Ubiquitina-proteassoma. 3. Metabolismo Celular. I. Seraphim, Patrícia Monteiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

## *DEDICATÓRIA*

Dedico este trabalho à minha mãe *Maria Machado de Oliveira*:  
mulher, mãe e amiga que jamais deixou de me apoiar mesmo sem  
entender muitas escolhas que fiz. Pelo exemplo diário e pelo Amor  
que só quem possui uma mãe assim pode sentir

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS - esta energia que me guia todos os dias, que me dá forças pra lutar e seguir em frente. E pela vida que a mim foi proporcionada.

À minha irmã Rosemeire de Oliveira Batista que sempre esteve presente em minha vida, que sempre me encorajou a viver com intensidade e determinação sem perder as raízes.

Às minhas sobrinhas-filhas Nathália de Oliveira Rodrigues e Nayara de Oliveira Rodrigues, extensões da minha família e crianças que ontem me fizeram sorrir e hoje mulheres que me fazem refletir como o tempo é precioso demais para ser desperdiçado.

A Cláudio Roberto Batista pelo apoio dado durante 4 anos de convivência e intensa reciprocidade, que Deus te ilumine meu amigo.

À Patrícia Monteiro Seraphim orientadora, professora e conselheira que me proporcionou experiências únicas, que confiou a mim a responsabilidade de desenvolver um projeto diferenciado e por ter investido na realização deste trabalho.

À Professora Rosa Maria Barilli Nogueira pelos incentivos, pelos ensinamentos e por ter realizado uma parte de extrema importância deste trabalho junto ao Biotério Central.

Ao Professor Ubiratan Fabres Machado pela autorização em utilizar seu laboratório para o processo de extração de proteínas.

À Patrícia Ebersbach pelos ensinamentos, paciência e empenho em auxiliar no processo de extração realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos alunos de graduação em Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista – Angelita da Silva e Kaique Marques pelo auxílio e pelos momentos de aprendizado e colaboração.

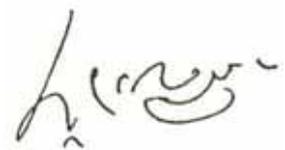
Aos funcionários do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – William, Moisés, Dionísio, Lucas, Matheus e Sidmar que foram parceiros de trabalho e pesquisa.

Aos membros que constituíam o Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPFis: Bruna Brasil Brandão, Danilo Antônio Corrêa Pinto Junior, Beatriz de Novais Oliveira Trombetta e Lidiane Monteiro Souza que foram companheiros, amigos e professores nesta árdua tarefa de pesquisar e tornar possível a realização de ideias e projetos. Que me apoiaram com sua atenção, amizade, paciência e muita dedicação.

Aos membros da atual formação do GPFis: Rafael Junges Moreira, Laís Regina Rossi, Lucas Agostini, Thaís Batista Dutra, Armando Neto e Tamara Gouveia por estes 2 anos de convivência e aprendizagem. Pelo apoio na realização deste projeto, pelos ensinamentos e amizades conquistadas.

Aos alunos do curso de graduação em Educação Física (2º ano – 2013) matutino da FCT UNESP de Presidente Prudente pela realização do estágio em docência e pelas experiências que pude desenvolver em pouco tempo de convivência.

***“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso.  
Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los.  
Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e  
despidos de orgulho.”***

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Lama' followed by a flourish.

*(Dalai Lama)*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1. Introdução .....	16
1.2. Mecanismos fisiológicos responsáveis pela captação de glicose .....	17
1.4. A via proteolítica dependente de ATP – ubiquitina-proteassoma.....	24
1.5. A relação existente entre a UPS e o Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	27
2. OBJETIVO.....	30
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	30
3.1. Procedimento experimental.....	30
3.2. Protocolo de treinamento de salto no meio líquido .....	32
3.3. Coleta do material .....	33
3.4. Quantificação do RNAm do gene Slc2a4, Gapdh, UBb, E <sub>2</sub> 14kDa, Trim63, NF $\kappa$ B e Prkaa2.....	34
3.5. Verificação da integridade do RNA total e obtenção do cDNA.....	35
3.6. Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação dos genes. ....	36
3.7. Preparação das amostras para o Western Blotting (quantificação de proteínas para o transportador de glicose GLUT4) .....	37
3.8. Western Blotting – método para quantificação de proteínas.....	38
3.9. Imunodeteção (Immunoblotting) – ECL (Enhanced Chemiluminescence).....	39
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO .....	53
7. CONCLUSÃO .....	59

8. ANEXOS .....	60
REFERÊNCIAS.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADA – Associação Americana de Diabetes

AICAR – 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP

APS – Persulfato de Amônio

ATP – Adenosina Trifosfato

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico (complementar)

CE – Controle Exercitado

CS – Controle Sedentário

DE – Diabetes Exercitado

DEPC – Dietilpirocarbonato

DM – Diabetes Mellitus

dNTP – Deoxynucleotide

DS- Diabetes Controle

DTT – Ditioneitol

EtBr – Brometo de Etídio

GLUT – Transportador de Glicose

HCl – Ácido Clorídrico

IRS – Substrato do Receptor de Insulina

Lys – Lisina

MgCl<sub>2</sub> – Dicloreto de Magnésio

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

MT – Membranas Totais

MuRF-1 – Muscle Ring Finger -1

NaCl – Cloreto de Sódio

NF-κB- Nuclear Factor-κB

NPH – Neutral Protamine Hagedorn

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PI3K – Fosfatidilinositol 3- kinase

PKB – Proteína B kinase

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – rotações por minuto

RT – Transcriptase Reversa

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

UI – Unidades Internacionais

UPS – Sistema Ubiquitina Proteassoma

UV – Ultravioleta

## RESUMO

Palavras-chave: Ubiquitina-proteassoma, Diabetes, Exercício Anaeróbio, Metabolismo

A literatura aponta que no diabetes mellitus, a expressão gênica de proteínas envolvidas no UPS (ubiquitine-proteasome system) encontra-se acima dos níveis basais, ocasionando degradação de proteínas miofibrilares. Sabe-se que a enzima de conjugação E<sub>2</sub>14kDa e ubiquitina ligase E3 - MuRF1 (Muscle Ring Finger-1) podem ser consideradas como biomarcadores de tal via. Os modelos de animais diabéticos apresentam maior expressão de NFκB (fator nuclear kappa B), o qual tem papel importante na regulação da transcrição do gene do GLUT4. O exercício físico configura-se como método terapêutico no tratamento do diabetes mellitus. A contração muscular melhora a captação de glicose na musculatura esquelética, translocando o GLUT4 via proteína cinase ativada por 5'-AMP (AMPK). **Objetivo:** Avaliar o efeito de seis semanas de treinamento de salto sobre conteúdo proteico de GLUT4, e expressão gênica (mRNA) dos genes Slc2a4 (proteína GLUT4), Ub (Ubiquitina), E<sub>2</sub>14kDa, Trim63 (proteína MuRF1), NFκB p105 e Prkaa2 (proteína AMPKα2) no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos. **Materiais e Métodos:** Estabelecemos 4 grupos crônicos: DEC (Diabetes Exercício), DSC (Diabetes Sedentário), CEC (Controle Exercício) e CSC (Controle Sedentário). O treinamento consistiu de 3 séries de 12 saltos em meio líquido com carga equivalente a 50% do peso corporal durante 6 semanas, 3 vezes/semana. Os grupos DE e CE foram submetidos ao Teste de Tolerância a Insulina (ITT), coleta de urina e mensuração da glicemia sérica. A eutanásia ocorreu por administração intraperitoneal de anestésico para coleta de tecidos e sangue. A expressão gênica foi quantificada pela técnica de RT-PCR e conteúdo proteico por Western Blotting. Para a análise estatística utilizamos o teste ANOVA one-way, com post-hoc (Tukey) quando necessário sendo  $p < 0,05$ . **Resultados:** Observou-se redução no peso de tecido adiposo dos animais diabéticos quando comparados aos controles. A musculatura gastrocnêmio estava reduzida nos animais diabéticos sedentários em comparação a todos os demais grupos. A musculatura glicolítica (EDL) se comportou de maneira semelhante com os animais diabéticos sedentários exprimindo os menores valores. A musculatura oxidativa (Sóleo) no grupo DEC

estava reduzida em comparação ao grupo CEC; o grupo DSC manteve considerável proteólise em relação a todos os demais grupos. O peso corporal total foi inferior nos diabéticos em relação aos controles. O ITT comprovou melhora na sensibilidade à insulina dos diabéticos. A glicemia pós treino apresentou considerável queda nos animais diabéticos exercitados após o período de treinamento. Para o gene *Slc2a4* observou-se aumento estatisticamente significativo nos animais diabéticos. Constatamos aumentos no gene *UBb* em ambos os modelos sedentários, e redução nos grupos exercitados. O grupo DEC apresentou os menores valores de expressão do gene *E<sub>2</sub>14kDa*. O gene *Trim63* apresentou-se elevado no grupo DSC em comparação a todos os demais grupos. O conteúdo proteico de GLUT4 esteve aumentado apenas no grupo CEC em comparação a todos os demais grupos.

**Conclusão:** O treino adotado promoveu ganho de massa muscular, melhora no perfil glicêmico e na sensibilidade à insulina, e exerceu efeito inibidor à proteólise na musculatura mista de animais diabéticos e controle. Entretanto efeitos sobre poliúria e conteúdo proteico de GLUT4 permaneceram inalterados.

## ABSTRACT

Keywords: Ubiquitin-proteasome, Diabetes, Exercise Anaerobic, Metabolism

The literature suggests that in diabetes mellitus, the gene expression of proteins involved in UPS (ubiquitine - proteasome system) lies above baseline levels, causing degradation of myofibrillar proteins. It is known that E214kDa conjugating enzyme and ubiquitin ligase E3 - MuRF1 (Muscle Ring Finger -1) may be regarded as biomarkers of this pathway. The models of diabetic animals shows increased expression of NFκB (Nuclear Factor kappa B), which plays an important role in the regulation of GLUT4 gene transcription. Exercise appears as a therapeutic method in the treatment of diabetes mellitus. Muscle contraction improves glucose uptake in skeletal muscle GLUT4 translocating protein kinase pathway activated by 5' - AMP (AMPK). **Objective:** To evaluate the effect of six weeks of jumping on GLUT4 protein content of training, and gene expression (mRNA) of Slc2a4 (GLUT4 protein), UBB (Ubiquitin), E<sub>2</sub>14kDa, Trim63 (MuRF1 protein) , NFκB p105 gene and Prkaa2 (AMPKα2) protein in the gastrocnemius muscle of diabetic rats . **Materials and Methods:** We established chronic 4 groups: DEC (Diabetes Exercise), DSC (Diabetes Sedentary), CEC (Control Exercise) and CSC (Control Sedentary). The training consisted of 3 sets of 12 jumps liquid mean supporting load equivalent to 50% of body weight for 6 weeks. DE and EC groups were submitted to the Insulin Tolerance Test (ITT), urine collection and measurement of serum glucose. Euthanasia was by intraperitoneal administration of anesthesia to collect blood and tissue. Gene expression was quantified by RT - PCR and protein content by Western blotting. For statistical analysis the one-way ANOVA test with post-hoc (Tukey) when necessary with  $p < 0.05$ . **Results:** We observed a reduction in weight of adipose tissue of diabetic animals compared with controls. The gastrocnemius muscle was reduced in sedentary diabetic animals compared to all other group. The glycolytic muscle (EDL) behaved similarly with sedentary diabetic animals expressing the lowest values. The oxidative muscle (Soleus) in DEC group was reduced compared to the CEC group, the DSC group maintained considerable proteolysis compared to all other groups. The total body weight was lower in diabetics than in controls. The ITT demonstrated

improvement in insulin sensitivity in diabetics. The post-training glucose showed significant decrease in diabetic animals exercised after the training period. For the Slc2a4 gene showed a statistically significant increase in diabetic animals. We found increases in the UBB gene models in both sedentary and reduction in exercise groups. The DEC group had the lowest values of gene expression E214kDa. The Trim63 gene is presented in high DSC group compared to all other groups. The protein content of GLUT4 was increased only in the CEC group compared to all other groups. **Conclusion:** The training adopted promoted gain muscle mass, improved glycemic control and insulin sensitivity, and exerted inhibitory effect on proteolysis in mixed muscles from diabetic and control animals. However effects on polyuria and GLUT4 protein content remained unchanged.

## **1. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1. Introdução**

A prática de atividade física para os portadores de diabetes mellitus (DM), induz a adaptações fisiológicas que promovem benefícios adicionais de extrema importância para melhorar a qualidade de vida. Segundo estudos, a prevenção vem por meio do estilo de vida, (TUOMILEHTO et al., 2001). A atividade física regular é recomendada para pacientes com DM e hipertensão arterial sistêmica (HAS), em virtude de efeitos benéficos sobre o risco cardiovascular, controle metabólico e prevenção das complicações crônicas das doenças (IRIGOYEN et al., 2003). Exercícios padronizados foram por muito tempo reconhecidos no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, que resulta em uma variedade de adaptações fisiológicas e metabólicas (ZANUSO et al., 2010). Entretanto, os mecanismos intracelulares pelos quais a atividade física melhora o perfil glicêmico em pacientes diabéticos permanecem apenas parcialmente conhecidos (PÁDUA et al, 2009).

O diabetes mellitus, ou DM, de acordo com Tavares et al., (2007), atualmente, configura-se em um crescente problema de saúde pública, que por sua vez, acomete a população idosa em virtude do aumento da expectativa de vida. O diabetes mellitus, ainda, contribui para a incapacidade funcional em idosos, fato corroborado por Alves et al., (2007), que consideraram tal associação envolver múltiplos fatores, pois esta doença está relacionada, sobretudo, a complicações vasculares e neuropáticas que, conseqüentemente, afetam a capacidade funcional.

Tavares et al., (2008), assinalam o diabetes mellitus como disfunção que apresenta alta taxa de morbi-mortalidade e perda na qualidade de vida. Constitui-se, ainda, em uma das principais causas de insuficiência renal, amputação de membros inferiores e cegueira. Mathias e Jorge, (2004), apontam um censo conduzido entre 1986 e 1988 em nove capitais em uma amostra da população adulta entre 30 e 69 anos de idade. A média geral da prevalência do DM para essas áreas foi de 7,6%, variando de 2,7% para a população de 30 a 39 anos, até 17,4% para a população de 60 a 69 anos.

Segundo a classificação apresentada pelas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, (2007), a DM é categorizada com o avanço dos estudos, de acordo com a epidemiologia, a fisiopatologia e a genética. Baseada nas classificações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA), a Sociedade Brasileira de Diabetes apresenta as seguintes classificações: Diabetes Mellitus tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos. Em qualquer um dos tipos, a principal consequência desta disfunção envolve alteração na captação de glicose em células adiposas e musculares.

## **1.2. Mecanismos fisiológicos responsáveis pela captação de glicose**

A insulina é um dos principais estimuladores da captação de glicose em células adiposas e musculares. A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade cinase intrínseca, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , denominado receptor de insulina (IR),

(PAULI et al., 2009). A captação de glicose ocorre via difusão facilitada mediada por uma família de proteínas transportadoras relacionadas estruturalmente, expressas de maneira tecido específica e nomeadas GLUT1 a GLUT7. O GLUT4 se expressa exclusivamente em insulino-sensíveis como o tecido adiposo, muscular esquelético e muscular cardíaco, e está normalmente associado a vesículas específicas relacionadas ao sistema de Golgi (GAZOLA, BAZOTTE e SOUZA, 2001). Contudo, trabalhos publicados em 2010 relatam a presença de 13 membros diferentes de GLUTs, denominados GLUT1 a GLUT12 e HMIT (transportador de mioinositol com H<sup>+</sup> acoplado). Dentre as isoformas, o GLUT4 é o principal transportador expresso no músculo esquelético, e a translocação do GLUT4 de um local intracelular para a membrana plasmática e túbulos T é um mecanismo maior pelo qual ambos, insulina e exercício, aumentam o transporte de glicose no tecido (JESSEN e GOODYEAR, 2006).

Pauli et al., (2009) corroboram que a ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). A fosforilação das proteínas IRS promove ativação de sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), promovendo sua ativação. Dentre suas ações, a ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (ou Akt), e isso permite o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação da proteína GLUT4 para a membrana celular.

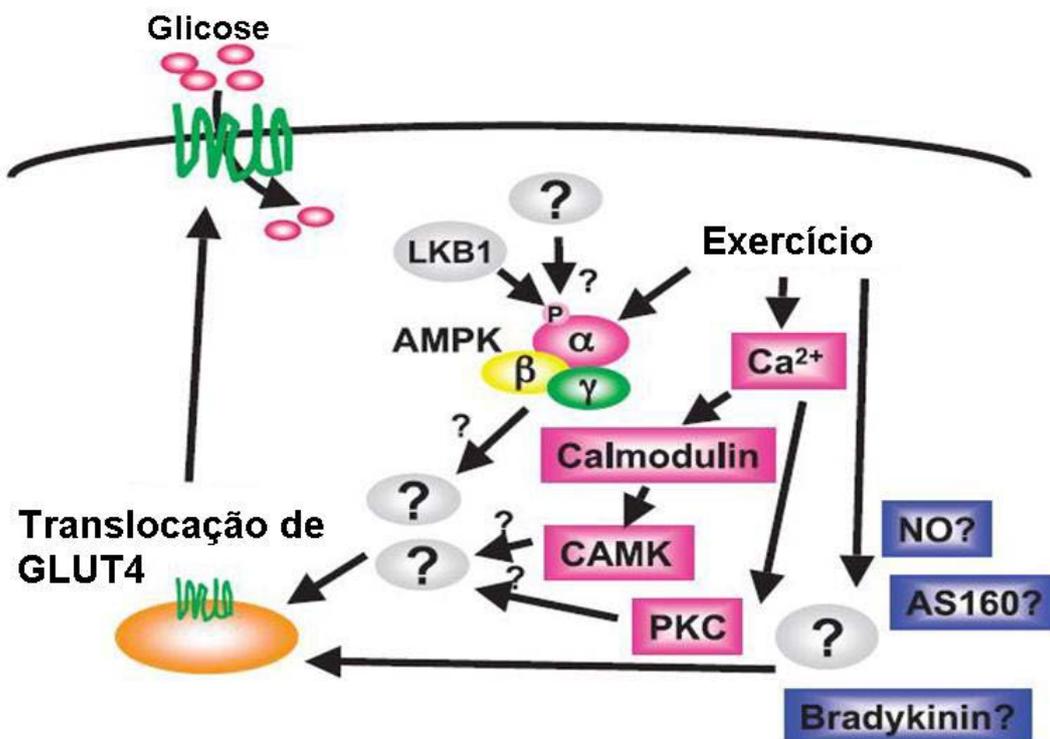
Importante ressaltar que a molécula de insulina não é responsável unicamente pela captação da glicose, mas todo o processo químico em cascata que é desencadeado pela sua ligação ao seu receptor específico de

membrana. Em adição à estimulação aguda do transporte de glicose, a ativação da AMPK desempenha um papel importante na capacidade para transporte de glicose induzindo um aumento na expressão de GLUT4 no músculo esquelético, (OJUKA, et al., 2002).

Jessen e Goodyear, (2005), consideram a AMPK um membro de uma família de proteínas cinases que consistem de 12 moléculas que se estendem de plantas a mamíferos. Pádua et al., (2009), definem a AMPK como uma enzima importante para a manutenção energética intracelular, especificamente durante situações de estresse, como o exercício físico ou privação alimentar. A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$ . Hardie, (2003), complementa essa informação ao afirmar que, cada subunidade existe como isoformas alternadas codificadas por 2 ou 3 genes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , e  $\gamma 3$ ), e todas as 12 diferentes combinações de isoformas parecem formar diferentes complexos. Em adição, a atividade da AMPK é aumentada por certos hormônios, tais como leptina e adiponectina, e por agentes farmacológicos, incluindo 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1 ribonucleoside (AICAR) e metformina. Estes agentes são utilizados no tratamento em modelos animais e/ou humanos resistentes à insulina e suas complicações, (TAO et al, 2010). A AMPK fosforilada ativa vias que geram o aumento de ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos ao mesmo tempo em que desativa as vias anabólicas que consomem o ATP, como a síntese de ácidos graxos, (ROPELLE, PAULI e CARVALHEIRA, 2005).

A importância de se compreender as especificações de tais estruturas no processo de captação da glicose no músculo esquelético se dá pelo fato de que em indivíduos diabéticos, a via de translocação do GLUT4 ativada por

AMPK representa um importante mecanismo fisiológico para a homeostase da glicose, o qual se encontra deficiente no processo de sinalização da insulina. Diferentes autores reportaram que a ativação da AMPK induzida pela contração muscular está envolvida com a captação de glicose em modelos experimentais e em seres humanos, através do aumento da translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana celular.



Fonte: Jessen e Goodyear, 2005

Entretanto, a prática de exercícios físicos por pessoas diabéticas sem controle glicêmico adequada ocasionaria os seguintes problemas: hipoglicemia, hiperglicemia e cetoacidose para diabéticos do Tipo 1, complicações cardíacas, inclusive morte súbita, sangramento da retina, perda de proteínas na urina, oscilação excessiva, para cima ou para baixo, da pressão sistólica, desenvolvimento de úlceras nos pés e danos ortopédicos, especialmente em

peças com neuropatias periféricas (MONTEIRO et al., 2009), a falta de controle glicêmico, também, pode acelerar o aparecimento de doenças cardiovasculares, renais e oftálmicas, resultando em risco elevado de morbidade e mortalidade (MORO et al., 2012). Nesse sentido, a monitorização adequada da glicemia e a supervisão de um profissional devidamente capacitado são fatores determinantes para uma prática de atividade física promotora de uma melhor qualidade de vida e sem riscos. A incidência de *diabetes mellitus* relaciona-se inversamente com o grau de atividade física. Isso é mais bem documentado para pacientes com alto risco de desenvolver diabetes. Exercícios físicos regulares (exemplo: 30min/dia de exercícios aeróbios em intensidade moderada, 60% do VO<sub>2</sub>máx) podem reduzir o risco da intolerância à glicose pela metade e os riscos de diabetes em até três quartos (SIXT et al., 2004).

### **1.3. Protocolos de treinamento e análises de parâmetros fisiológicos em ratos diabéticos**

Em um estudo desenvolvido por Lahaye et al., (2011), animais diabéticos expostos a um protocolo de treinamento combinado (constituído por corrida em esteira adaptada para roedores, 25m.min<sup>-1</sup>, 60 minutos, 5 dias/semana durante 8 semanas) com insulino terapia apresentaram poucas alterações sem diferença estatística em parâmetros como peso corporal (419,2±15,7g e 395,2±14,6g) e concentrações de glicose sanguínea entre os animais tratados com insulina e os que receberam insulina mais o treinamento em esteira rolante (11,8±0,8mmol.L<sup>-1</sup> e 12,6±0,8mmol.L<sup>-1</sup>), porém, o treinamento físico

atenuou a hipertrofia cardíaca observada em animais diabéticos. Tais achados foram corroborados por Silva et al., (2004), que não observaram diferença estatística nas concentrações circulantes de glicose de ratos diabéticos por administração de streptozotocina e submetidos ao treinamento em meio líquido com carga equivalente a 5% do peso corporal, 1 hora/dia, 5 dias/semana durante 8 semanas.

Em estudo recente utilizando um programa para ratos diabéticos induzidos por streptozotocina, Liang, et al., (2012), comprovaram que a liberação de galanina induzida por exercício aumenta a expressão gênica de RNAm de GLUT4 em adipócitos. O treinamento consistiu de nado em tanque sendo 1 hora/dia, 5 dias/semana por 4 semanas. O exercício pode significativamente modular a sinalização da insulina através da expressão de proteínas relacionadas à captação de glicose, como o GLUT4, Proteína B kinase - PKB e PI3K na musculatura de ratos diabéticos expostos a exercícios de natação por 4 semanas, conforme (CAO, et al., 2010).

O exercício em esteira diminuiu as concentrações séricas do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em 6%, do Fator quimiotático neutrófilo induzido por citocina 2 alpha/beta (CINC-2 $\alpha/\beta$ ) em 9%, da Interleucina (IL)-1 $\beta$  em 34%, da Interleucina 6 (IL-6) em 86%, da Proteína C Reativa (CRP) em 41%, além de reduzir em 40% as concentrações circulantes de ácidos graxos. O estímulo aplicado foi de 3 semanas de exercício em esteira a 60% do  $VO_{2max}$ , 30 minutos por dia, 6 dias por semana, (BELOTTO et al., 2010).

Animais em diferentes estágios do diabetes apresentaram glicemia controlada ou até mesmo prevenção no início da doença, em protocolo de corrida de 1 hora/dia em 5 dias consecutivos, a 16/22 minutos por 5 semanas

ou 12/16 minutos por 7 semanas, Hwang, et al., (2011), o que corrobora os dados apresentados por Nam, et al., (2011), relativos à aplicabilidade deste mesmo protocolo de exercícios em esteira na prevenção do diabetes mellitus.

As alterações decorrentes de diabetes severa também podem ser modificadas mediante aplicação de um protocolo de exercício aeróbio em esteira. Al-Jarrah et al., (2010).

Rogatto et al., (2004), analisaram as respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. O exercício consistiu de saltos em meio líquido com 50% de carga do peso corporal (PC), sendo, 4 séries de 10 saltos com 1 minuto de intervalo entre as séries. A ADA - Associação Americana de Diabetes, (2004), preconiza que a realização de exercício físico interfere sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos, tendo em vista a mobilização dos estoques de glicogênio muscular e hepático e o aumento das concentrações de glicose e AGL.

Pauli et al., (2009), desenvolveram um programa constituído de natação, no qual os ratos obesos nadaram uma 1h/dia, 8 semanas com carga progressivamente aumentada de 2,5% a 5% do peso corporal. Houve, portanto, aumento da expressão de AMPK $\alpha$  e ACC na musculatura esquelética, bem como aumento na sensibilidade à insulina. Em relação ao controle glicêmico mediante nado em tanque coletivo por 6 semanas, com peso equivalente a 3,5% do peso corporal, Moura, et al., (2012) concluíram que não houve melhora na homeostase glicêmica de ratos diabéticos, mediante análise de tolerância á glicose e sensibilidade periférica à insulina, durante o teste de Tolerância a Glicose (GTT) e Teste de Tolerância a Insulina (TTI), respectivamente.

#### **1.4. A via proteolítica dependente de ATP – ubiquitina-proteassoma**

Além das dificuldades enfrentadas por portadores de DM como segregação social e custo para manter medicamentos anti-hiperglicemiantes disponíveis, esta população, comumente, acaba sendo obrigado a conviver com outras complicações advindas do diabetes como a quebra de proteínas de maneira significativa. A sarcopenia como forma expressiva de perda da qualidade muscular e consequente produção de força é definida como a perda degenerativa e não intencional de fibras musculares esqueléticas, e, consequentemente, da força, associada ao estresse oxidativo e subsequente liberação de ROS (espécies reativas de oxigênio), além de outros fatores contribuintes como o envelhecimento, (LENK, K., SCHULER, G., ADAMS, V., 2010).

Estudos experimentais em modelos de animais diabéticos indicaram que o aumento na degradação de fibras musculares esqueléticas é uma característica típica de caquexia e ativação da via de sinalização da ubiquitina-proteassoma (UPS), e, tais estudos corroboram a prerrogativa de que este sistema desempenha importante papel na proteólise (RUTTEN, E., et al., 2006). Em determinadas doenças como o DM, por exemplo, a perda de fibras musculares é uma das complicações mais comuns, e, em tais casos, a degradação proteica é potencializada e a síntese proteica encontra-se diminuída, agravando o quadro do paciente (CHEN, et al., 2011).

Em relação à via de sinalização da ubiquitina-proteassoma (UPS), podemos dividir o processo em duas etapas distintas e sucessivas: (1) a ligação covalente de múltiplas moléculas de ubiquitina à proteína alvo; e, (2)

degradação da proteína marcada pelo proteassoma 26S. Inicialmente a ubiquitina é ativada em seu resíduo terminal C pela enzima de ativação E1. Após a ativação, uma das várias enzimas E2 (enzimas de conjugação da ubiquitina) transferem a ubiquitina de E1 para um membro de uma família de proteínas ligases da ubiquitina, E3, no qual o substrato proteico é ligado. Esta enzima catalisa o último passo no processo de conjugação, a ligação covalente da ubiquitina ao substrato. A primeira metade é transferida a um grupo  $\epsilon$ -NO<sub>2</sub> de um resíduo Lys do substrato da proteína para gerar uma ligação isopeptídica. A primeira metade também pode estar conjugada de um modo linear para o resíduo N-terminal do substrato. Em reações sucessivas uma cadeia de poliubiquitinas é sintetizada por transferência de ubiquitinas adicionais ao resíduo Lys48 da molécula previamente conjugada. A cadeia serve, muito provavelmente, como um marcador para o reconhecimento da proteólise pelo proteassoma (CIECHANOVER, A., 1998). A Figura 1 a seguir ilustra com clareza esse processo:

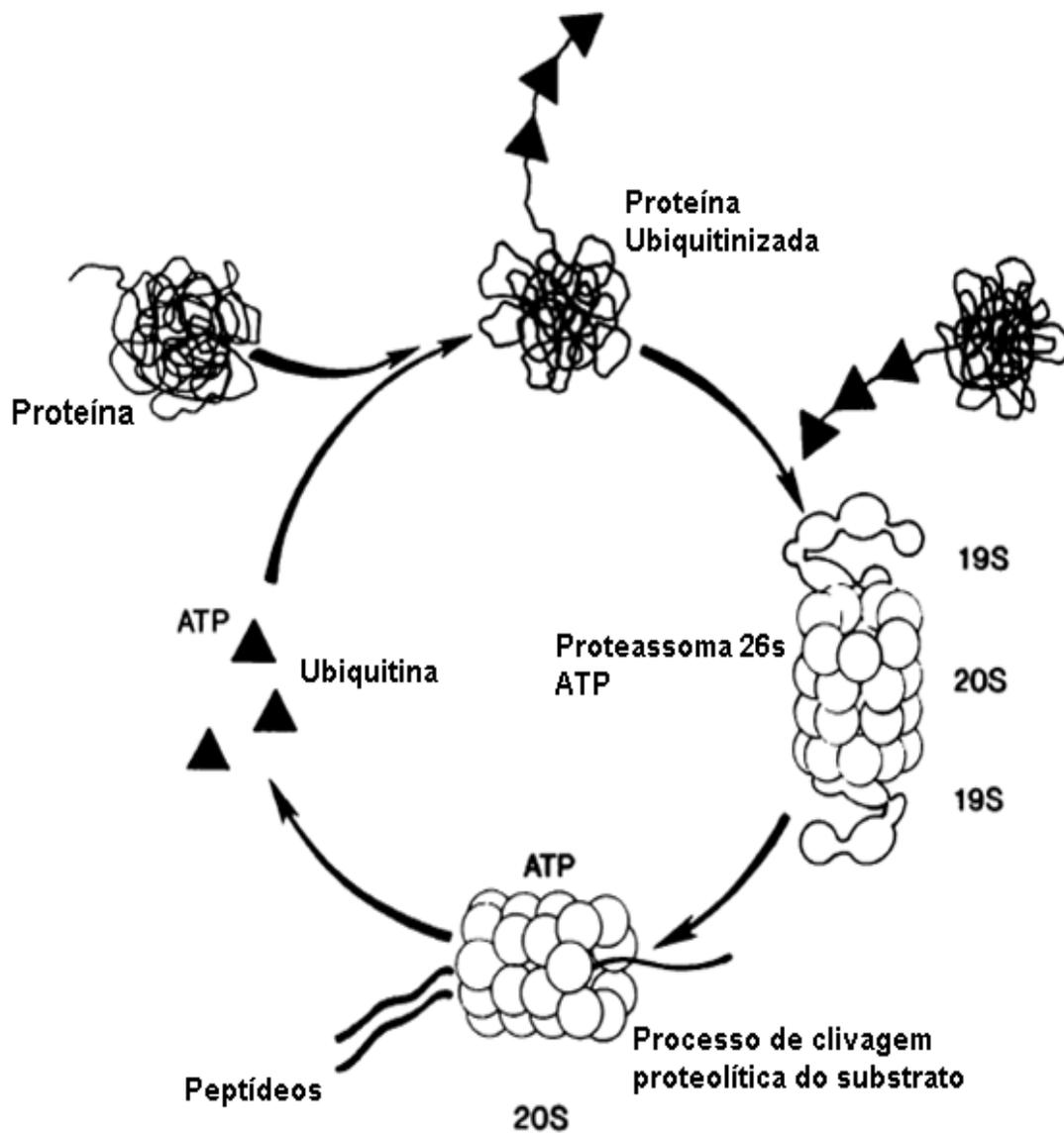


Figura 1: Sistema proteolítico dependente de ATP  
 Fonte: adaptado de Hasselgren e Fischer, 1999.

Dentre as diversas enzimas que constituem as estruturas responsáveis pelo processo de reconhecimento e degradação de proteínas, destacaremos em nossos estudos duas principais: MuRF1, uma enzima ligase E3, e relacionada a um processo acelerado de proteólise bem como um

mediador molecular de atrofia muscular, muito expresso em fibras musculares e no músculo cardíaco (CHEN et al, 2011). Outra enzima de suma importância que selecionamos para nossos estudos é a E<sub>2</sub>14kDa, sendo considerada uma enzima de conjugação, E2, e sítio de regulação na via de sinalização da ubiquitina-proteassoma no músculo esquelético (HOBLER et al., 1999).

### **1.5. A relação existente entre a UPS e o Fator Nuclear-κB (NF-κB)**

Nos modelos experimentais, animais que recebem dose única de 42mg/kg corpóreo de aloxana, apresentam geração de ROS (espécies reativas de oxigênio). Com isso, ocorre indução da atividade do NFκB, o que aumenta as propriedades de sua ligação ao extrato nuclear pancreático. Em muitas células, a proteína NFκB está localizada no citoplasma ligada a uma família de proteínas inibidoras, conhecidas como IκB. Tais proteínas bloqueiam o sinal nuclear do NFκB e ajudam a manter tal estrutura no citoplasma, (YAMAMOTO, 2001).

O NFκB exerce papel fundamental na transcrição de genes específicos no núcleo celular, onde ele é apto a interferir em diferentes genes alvo ao longo de um repertório de mais de 200 genes implicados na apoptose celular, no crescimento celular, na resposta imune e inflamação. (NOGUEIRA, L., et al., 2011). Uma ampla variedade de estímulos tais como produtos bacterianos, parasitários, vírus e produtos virais, citocinas inflamatórias, células T, células B, inibidores da síntese proteica, estresse oxidativo e físico e uso de drogas levam a uma aceleração do precursor, degradação do inibidor e



inibidor da transcrição gênica de GLUT4, que como citado anteriormente, é caracterizado como o mediador da ação de citocinas tais como o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-1 $\beta$  e Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE/AGER), (ALVEZ et al., 2005). Apesar do estímulo insulínico e da atividade contrátil promoverem a translocação da proteína GLUT4, seu impacto sobre o GLUT4 e os mecanismos envolvidos ainda não foram bem caracterizados, (SILVA, J. et al., 2005).

Grande parte dos modelos experimentais de exercício físico tem sido baseado em exercícios aeróbios, de longa duração e baixa-moderada intensidade, o que gera dúvidas sobre os possíveis efeitos de esforços mais intensos e intermitentes sobre as adaptações geradas pelo treinamento. Sendo assim, esse estudo faz-se necessário devido à escassez de informações na literatura que abordam os efeitos do exercício anaeróbio no metabolismo da glicose e catabolismo muscular em ratos diabéticos induzidos por aloxana auxiliando na elaboração de novos possíveis programas de treinamento para portadores de diabetes mellitus tipo 1, que, ainda devido à dificuldade de disseminação da prática esportiva para esse público em questão, encontram-se à mercê apenas da insulino-terapia como principal método regulador da glicemia.

## **2. OBJETIVO**

Compreender o efeito de seis semanas de treinamento de salto em meio líquido sobre conteúdo proteico e expressão gênica (gene *Slc2a4*) da proteína transportadora de glicose - GLUT4 respectivamente, expressão gênica da Ubiquitina (gene *UBb*), da enzima de conjugação E<sub>2</sub>14kDa, MuRF1 – ubiquitina ligase E3 (gene *Trim63*), do Fator Nuclear – NF-κB, e da proteína cinase ativada por AMP – (gene *Prkaa2*), no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por administração de aloxana.

## **3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

### **3.1. Procedimento experimental**

Para o procedimento experimental, inicialmente, foram obtidos 40 ratos machos da linhagem Wistar, 2 meses de idade, peso corporal na média de 250 g ± 33,5g (calculados por média ± desvio padrão) que, foram divididos inicialmente e randomicamente em: grupo controle sedentário (CS) – 20 animais, grupo diabético sedentário (DS) – 16 animais. Posteriormente estes animais foram submetidos à semana de adaptação ao treinamento (descrito no item 3.2) e aqueles que conseguiram nadar e se sentiram mais confortáveis foram alocados nos grupos exercitados, estabelecendo assim os seguintes grupos experimentais: grupo controle sedentário (CS) – 10 animais, grupo

diabético sedentário (DS) – 8 animais, controle exercitado (CE) – 10 animais, grupo diabético exercitado (DE) – 08 animais.

Os animais se tornaram diabéticos após receberem uma dose única de Aloxana a 120 mg/kg peso corpóreo, administrada via intraperitoneal, conforme protocolo estipulado por Freitas et al., 2005. Após a aplicação de aloxana, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e receberam água com glicose durante as primeiras 24 horas. Posteriormente, os animais foram mantidos à temperatura média de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 7:00 as 19:00 (período claro) e das 19:00 as 7:00 (período escuro). Estes animais foram alimentados com ração padrão (Supra Lab, Alisul Ind. Alimentos LTDA, RS) e água fornecida ad libitum. Os animais controle receberam solução salina (NaCl 0,9%) via intraperitoneal como solução placebo para mimetizar o estresse provocado aos diabéticos pelo manuseio e introdução da agulha na região indicada.

Para a constatação da instalação do diabetes mellitus, após 7 a 21 dias foi avaliado o volume de urina excretado, bem como presença ou não de glicosúria e glicemia com valores  $>200$  mg/dL. A glicemia foi aferida por glicosímetro (Biocheck, Bioeasy Diagnostica), após corte na região distal da cauda para coleta de gota de sangue na glicofita. A insulina para controle glicêmico foi administrada via subcutânea, sendo 2UI (Unidades Internacionais) pela manhã (por volta das 9 horas), do tipo NPH com ação intermediária, considerando-se o início da ação de 1-3 horas da aplicação e pico de 8-12 horas.

### **3.2. Protocolo de treinamento de salto no meio líquido**

Os animais passaram por um período de adaptação ao meio líquido seguindo o protocolo estipulado por Ribeiro et al, (2012), onde os animais permaneceram durante 5, 10 e 15 minutos em água rasa; 5, 10 e 15 minutos em água profunda; 5 minutos com um colete acoplado ao tórax; e, 5, 10 e 15 minutos com um colete contendo uma carga equivalente à 3% do peso corporal do animal. O protocolo de treinamento foi baseado nos estudos de Rogatto et al., (2004), onde os animais dos grupos exercitados realizaram uma sessão de atividade física que consistiu de saltos em tanque com água, com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal de cada animal, acoplado ao tórax. A sessão de exercícios consistiu da realização de 3 séries de 12 saltos com 1 minuto de intervalo entre as séries sendo 3 vezes por semana, durante 6 semanas. Os saltos foram realizados em um tubo de PVC com 250 mm de diâmetro, visando limitar as alternativas do animal em seguir para outra direção, favorecendo o salto vertical. A contagem das repetições ocorreu cada vez que o animal se projetou em direção à superfície da água para respirar. A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato, Azevedo, 1994 apud Rogatto et al, 2004. A figura 3 a seguir ilustra com mais clareza esse procedimento:

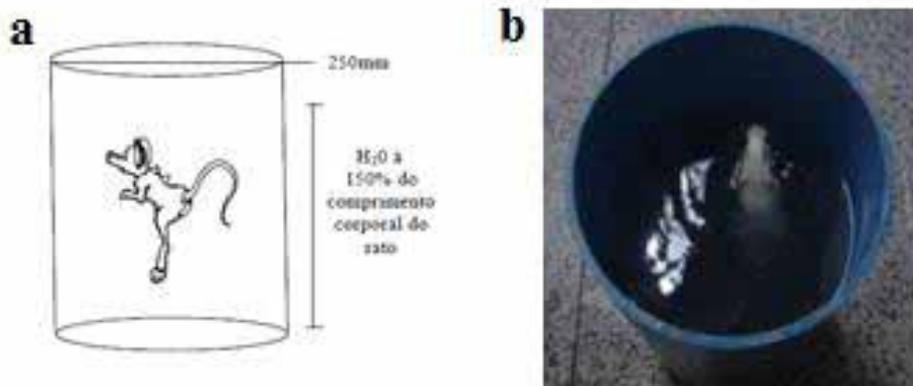


Figura 3: a) Instrumento para realização de saltos em tanque; b) Instrumento utilizado em nosso laboratório.

Fonte: Rogatto et al., 2004.

### 3.3. Coleta do material

A realização dos exercícios foi de seis semanas, sendo a primeira semana para adaptação ao meio líquido. Os grupos CE (Controle Exercitado), DE (Diabético Exercitado) foram expostos ao protocolo de treinamento em meio líquido. Segundo Zanchi et al, 2009, o pico de expressão gênica da MuRF-1 ocorre 24 horas após a última sessão de treinamento resistido, o que nos levou a padronizar o sacrifício após 24 horas da última sessão de treino do período de 6 semanas de exercícios. Para o procedimento de extração foi adotada administração intraperitoneal de tiopental sódico (40 mg/kg PC). Amostras do músculo gastrocnêmio de ambos os grupos foram coletadas para análise, sendo, posteriormente identificados, congelados em nitrogênio líquido e guardados a temperatura de -80°C para um processamento subsequente. Todo o procedimento foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local sob o protocolo nº 02/2012 (vide ANEXOS, p.21).

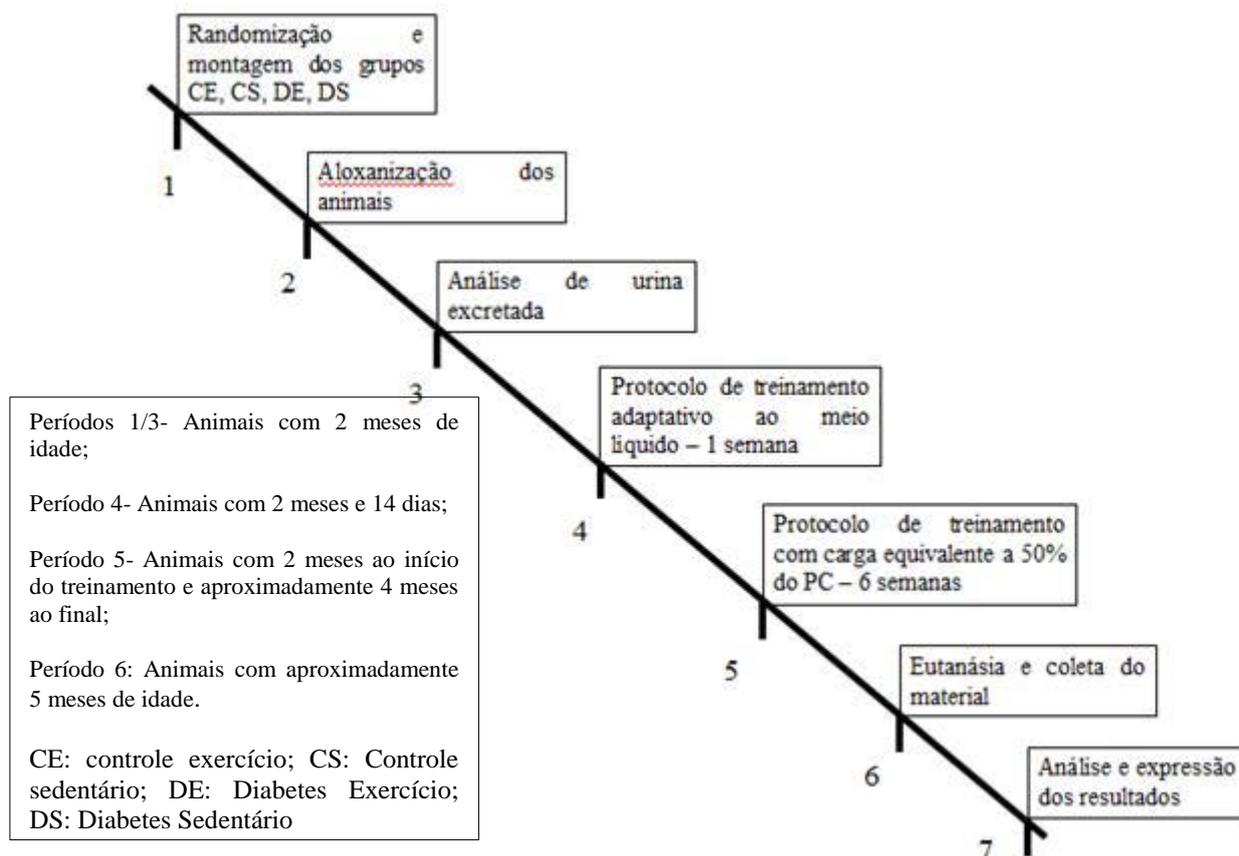


Figura 4: Organograma do desenho experimental – randomização, indução do diabetes, treinamento, eutanásia e análise.

### 3.4. Quantificação do RNAm do gene Slc2a4, Gapdh, UBb, E<sub>2</sub>14kDa, Trim63, NFκB e Prkaa2.

As amostras de tecido musculares foram homogeneizadas em homogeneizador modelo OMNI TH – USA (Life technologies™ - GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) com BrazolReagent® (Invitrogen) conforme especificação do fabricante, para obtenção do RNA total das amostras.

A análise da concentração de RNA total foi feita utilizando-se 1 µL da amostra solubilizada de RNA total adicionado a 79 µL de água DPEC para

leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, AmershamBiosciences, GE Healthcare) em 260nm.

### **3.5. Verificação da integridade do RNA total e obtenção do cDNA**

Para verificar a integridade do RNA total extraído foi realizada uma preparação das amostras para corrida eletroforética em gel de agarose. 1 µg de cada amostra foi acrescido a 1 µL de Brometo de Etídio (EtBr). Em seguida, tal mistura foi aplicada no gel de agarose 1% e corridos com tampão de corrida *Running Buffer* 1X (75V, 400mA, ~ 45min) e verificados em UV, observando a presença e qualidade das duas bandas, 28S e 18S, com relação de 1,5/1. As imagens foram obtidas através do sistema de fotografia KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0,2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc..

Amostras de 5 µg de RNA total que foram extraídas 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 casa amostra: 1 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, 4 µL de tampão da enzima (50mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>), 2 µL DTT (10 mM), 1 µL mistura de dNTPs (0,5 mM cada), 0,5 µL Random (0,3 µg/µL) e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (200U; Invitrogen®, EUA), em volume final de 8,5 µL, completos com H<sub>2</sub>O DEPC. As amostras passaram por uma série de incubações, sendo 10 minutos a 25°C para ligação do Random, 1 hora a 42°C na presença de 1 µL da enzima para anelamento e extensão, 15 minutos a 70°C para desnaturação da enzima e fim da reação.

### 3.6. Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação dos genes.

O protocolo da Reação em Cadeia de Polimerização(PCR) utilizado foi: alíquotas de 1µL do produto final de RT-PCR (cDNA), juntamente com 10pmol dos primers específicos para os genes abaixo:

**Quadro 1: Relação dos genes específicos que foram analisados e seus respectivos primers**

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>
<b>Prkaa2</b>	Sense 5' – AATAATGAACCAAGCCAGTG – 3' Antisense 5' – CTCCGCCATAATGTTCGTATG – 3'
<b>E214kDa</b>	Sense 5' – GTGCACCATCTGAAAACAACA – 3' Antisense 5' – AGACATCCTGCAGAACCGAT 3'
<b>Gapdh</b>	Sense 5' – ACATCATCCCTGCATCCACT - 3' Antisense 5' – GGGAGTTGCTGTTGAAGTCA – 3'
<b>Trim63</b>	Sense 5' – ATCACTCAGGAGCAGAGGA - 3' Antisense 5' – CTTGGCACTCAAGAGGAAGG - 3'
<b>NFκB p105</b>	Sense 5' – AAGACTATTGAGCGAACCTT – 3' Antisense 5' – TTGGAATTGACTGACTGACA – 3'
<b>Slc2a4</b>	Sense 5' – CCCCTCCAGGGCAAAGGAT – 3' Antisense 5' – TCCTGGAGGGGAACAAGAA – 3'
<b>UBb</b>	Sense 5' – TCTTCGTGAAGACCCTGACC – 3' Antisense 5' – CAAGGTGCAGGGTTGACTCTT – 3'

Todos os oligonucleotídeos supracitados foram submetidos à amplificação em 24 µL de um “mix” contendo 5,0 µL de tampão 10x Taq

Polimerase (Promega®), 1,5 µL de cada dNTPmix 10 mM, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,125 µL da enzima Taq DNA Polimerase [5U/µL] (Promega®) 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 e posterior anelamento com temperaturas específicas para cada primer conforme padronização realizada, e extensão de 72°C por 45s. Por fim, o material foi resfriado a 4°C até 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 o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), apropriado para este fim.

A expressão do RNAm para os genes Slc2a4, E<sub>2</sub>14kDa, UBb, Pkrra2, Trim63 e NFκB p105 foi normalizada pela expressão da Gapdh (proteína constitutiva), calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo.

### **3.7. Preparação das amostras para o Western Blotting (quantificação de proteínas para o transportador de glicose GLUT4)**

Para a técnica de Western Blotting foi utilizado o músculo esquelético gastrocnêmio em membranas totais (MT). Para isso os tecidos

foram homogeneizados e posteriormente centrifugados a 1000g durante 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1000g) por 10 minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes foram somados e então submetidos à uma ultracentrifugação a 150.000g por 75 minutos, a 4°C. O sedimento correspondeu à fração de membranas totais (MT), foi ressuspenso em 600 µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a posterior utilização.

### **3.8. Western Blotting – método para quantificação de proteínas**

Inicialmente as amostras foram submetidas à uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Com essa técnica é possível separarmos as proteínas segundo seu peso molecular sem que as unidades protéicas sejam perdidas. Foi utilizado o método citado por Gomes, 2010, o qual envolve a utilização de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de empacotamento (stacking gel – Acrilamida 5,8%; Bisacrilamida 0,16%; Tris 0,5M pH 6,8; EDTA 8mM; SDS 0,1% TEMED 0,05%; persulfato de amônio 0,06%) e o gel de separação (resolving gel – Acrilamida 9,7%; Bisacrilamida 0,3%; Tris 1,5M pH 8,9; EDTA 8mM; SDS 0,125%, TEMED 0,05% persulfato de amônio 0,05%).

Amostras de frações de membrana (20-30µg de proteína / lane, dependendo do tecido) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05M, Bromophenol Blue 0,05%, SDS 9%, 2-Mercaptoetanol 6%) e,

então, submetidas a fervura sob 95°C durante 5 minutos para posterior corrida em gel.

A eletroforese vertical foi iniciada sob voltagem constante em 75mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que pode ser observado na transição dos dois géis (aproximadamente 1 hora e 30 minutos). Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante de 55mA para a corrida no gel de separação (aproximadamente 4 horas e 30 minutos), utilizando-se como tampão de corrida Tris 25mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2mM, pH 8,3. Juntamente com as amostras sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores), o que facilitará a localização da proteína desejada para o estudo.

Após a separação das frações proteicas em gel de poliacrilamida, foi realizada a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super(GE Healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK).

A transferência foi realizada sob corrente constante de 42mA, em temperatura de 40°C por 16 horas, utilizando-se como tampão de transferência Tris 12,5mM, Glicina 95mM, metanol 20%, pH 8,3. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Comassie.

### **3.9. Imunodeteção (Immunoblotting) – ECL (Enhanced Chemiluminescence)**

Após a transferência eletroforética, foi iniciado o processo de imunodeteção. Primeiramente, realizou-se um bloqueio inespecífico com leite desnatado – 23g de leite em 100ml de PBS 1X (NaCl 0,8%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>[12H<sub>2</sub>O] 0,115%, KCl 0,02%, KH<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub> 0,02%) durante 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti- GLUT4 (antissoro comercial de coelho – Chemicon International, Temecula, California) com diluição de 1:3000 em PBS 1X + BSA 8%), durante 3 horas a 37°C.

Posteriormente a membrana recebeu uma série de 3 lavagens de 5 minutos com 10 ml de solução de lavagem (PBS 1X + 0,1% Tween 20). Em seguida foi realizada uma incubação com o anticorpo secundário anti-IgG (GE Technologies®) de coelho, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:10000, em solução bloqueadora (1g de leite em pó + 20ml de PBS 1X + 0,05% de Tween 20) durante 1 hora. A membrana foi lavada vigorosamente com solução de lavagem e colocada em contato com solução de detecção (H<sub>2</sub>O destilada + Luminol + Ácido P-Cumárico + Tris 1M [pH8,5] + Peróxido de Hidrogênio) por 1 minuto – reação de ECL.

Por fim, a membrana foi exposta a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1,5 a 3 minutos para detecção das bandas resultantes. Após este período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora (KODAK), sendo evidenciados os “blots” correspondentes à proteína transportadora GLUT4. A normalização utilizou como parâmetro os blots corados com Ponceau ao final do processo de transferência para membrana de nitrocelulose.

O filme foi fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as

imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o software ScionImage for Windows (Scion Corporation, EUA). A intensidade dos “blots” e os resultados em cada membrana foram normalizados considerando-se 100% o valor obtido pelo grupo controle (GC).

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação dos valores de perda percentual de peso corporal, sensibilidade à insulina após seis semanas de treino, da expressão gênica, conteúdo e fosforilação das proteínas foi realizado o teste de ANOVA one-way com *post-hoc* (Newman-Keulls) quando necessário. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de  $p < 0,05$ . O pacote estatístico utilizado foi Graph Pad Prism 5.0 for Windows.

#### **5. RESULTADOS**

Na Tabela 2, pode-se observar que os animais dos grupos crônicos (DEC, DSC, CEC e CSC) obtiveram alterações interessantes, no que concerne aos dados relacionados às massas de diferentes estruturas. Os animais dos grupos DEC e DSC apresentaram massa adiposa inferior aos animais do grupo CSC. O grupo DEC demonstrou ganhos de massa magra (músculo gastrocnêmio) superiores aos animais sedentários (DSC) e igualou seus parâmetros aos controles (CEC e CSC). A musculatura glicolítica (EDL) se alterou ao longo do treino com maior variabilidade intergrupos, o grupo DEC

apresentou peso de músculo inferior ao grupo CEC; o grupo DSC, entretanto, demonstrou peso inferior a todos os demais grupos inclusive o grupo diabético treinado. O grupo CSC também obteve ao longo de 6 semanas de observação peso inferior ao grupo CEC. A musculatura solear no grupo DEC apresentou peso inferior ao grupo CEC. O DSC, como previsto demonstrou alterações inferiores de peso solear em relação a todos os demais grupos. Os grupos diabéticos (sedentário e controle) apresentaram valores de peso corporal absoluto reduzido em comparação aos grupos controle.

Tabela 2: Demonstrativo de massa em gramas de tecido muscular e tecido adiposo retrorenal de ratos diabéticos induzidos e expostos ao treinamento anaeróbio crônico em meio líquido

	DEC	DSC	CEC	CSC	p
Gordura (g)	0,165±0,11 $\beta$	0,776±0,30 $\epsilon$	1,54±0,36 $\xi$	2,27±0,24	0,0008
Gastrocnêmio (g)	1,124±0,10	0,859±0,11*	1,43±0,06	1,32±0,05	0,001
EDL (g)	0,113±0,009 $\#$	0,089±0,01 $\&$	0,146±0,005	0,12±0,005 $\zeta$	0,0004
Sóleo (g)	0,133±0,008 $\S$	0,110±0,006 $\times$	0,159±0,003	0,14±0,007	0,0003
Peso Corporal (g)	239,8±9,86 $\text{£}$	240,6±12,1 $\text{£}$	304,1±5,88 $\text{¢}$	340,1±12,8	0,0001

Demonstrativo de parâmetros morfométricos de ratos diabéticos expostos a um protocolo de exercício anaeróbio de 6 semanas em meio líquido. Valores expressos em média  $\pm$  EPM;  $\beta$  p < 0,0008 para DEC vs CSC;  $\epsilon$  p < 0,0008 para DSC vs CSC;  $\xi$  p < 0,0008 para CEC vs. CSC; \*p < 0,001 para DSC vs. DEC, CEC e CSC;  $\#$  p < 0,0003 para DEC vs CEC,  $\&$  p < 0,0004 para DSC vs DEC, CEC e CSC,  $\zeta$  p < 0,0004 para CSC vs CEC;  $\S$  p < 0,0003 para DEC vs CEC;  $\times$  p < 0,0003 para DSC vs. DEC, CEC e

CSC. £  $p < 0,0001$  para DSC; DEC vs. CSC e CEC; ¢  $p < 0,0001$  para CEC vs. CSC. Valores expressos mediante aplicação de teste estatístico para análise paramétrica – ANOVA One-way com pós teste de Newman Keulls,  $p < 0,05$ .

Na Figura 5 é apresentado o valor do kITT (constante de decaimento da glicose) obtido durante o teste de tolerância à insulina dos grupos diabéticos exercitados e controles exercitados. Observa-se diferença significativa na sensibilidade à ação insulínica ( $p < 0,0159$ ), com o grupo diabético apresentando maior kITT, ou seja, maior sensibilidade à insulina. Vale ressaltar que estes animais, embora diabéticos, apresentavam-se sob insulino terapia.

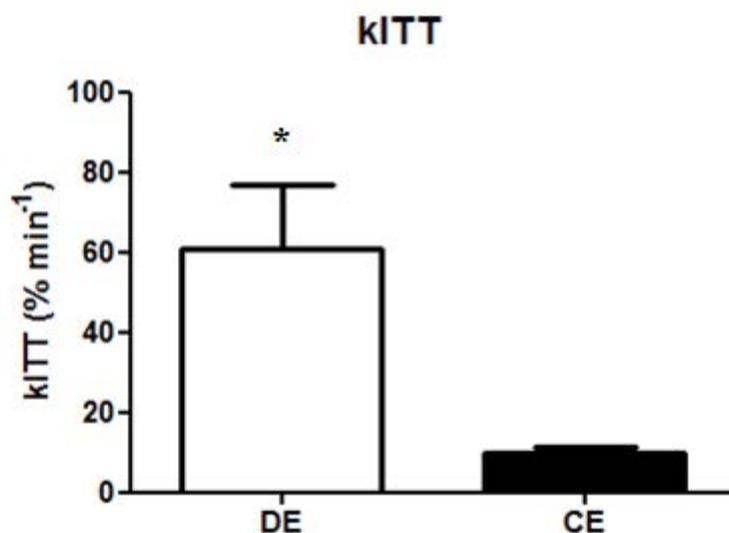


Figura 5: Constante de decaimento da glicose sérica (kITT) analisada em animais diabéticos e controles expostos ao treinamento anaeróbico crônico de 6 semanas. Valores expressos em Média ± EPM. \*  $p < 0,0159$  para DE vs CE.

Dados obtidos através das análises de glicemia sérica após 6 semanas podem ser observados na Figura 6. O exercício anaeróbico foi eficaz em reduzir a glicemia sérica após 6 horas de treino, enquanto que os animais do grupo CEC não obtiveram alterações significativas em nenhuma etapa de análise. O treinamento crônico se mostrou eficaz em melhorar o perfil glicêmico em relação ao treinamento agudo; as alterações em modelos de diabetes responderam de maneira significativa aos estímulos em relação aos animais saudáveis.

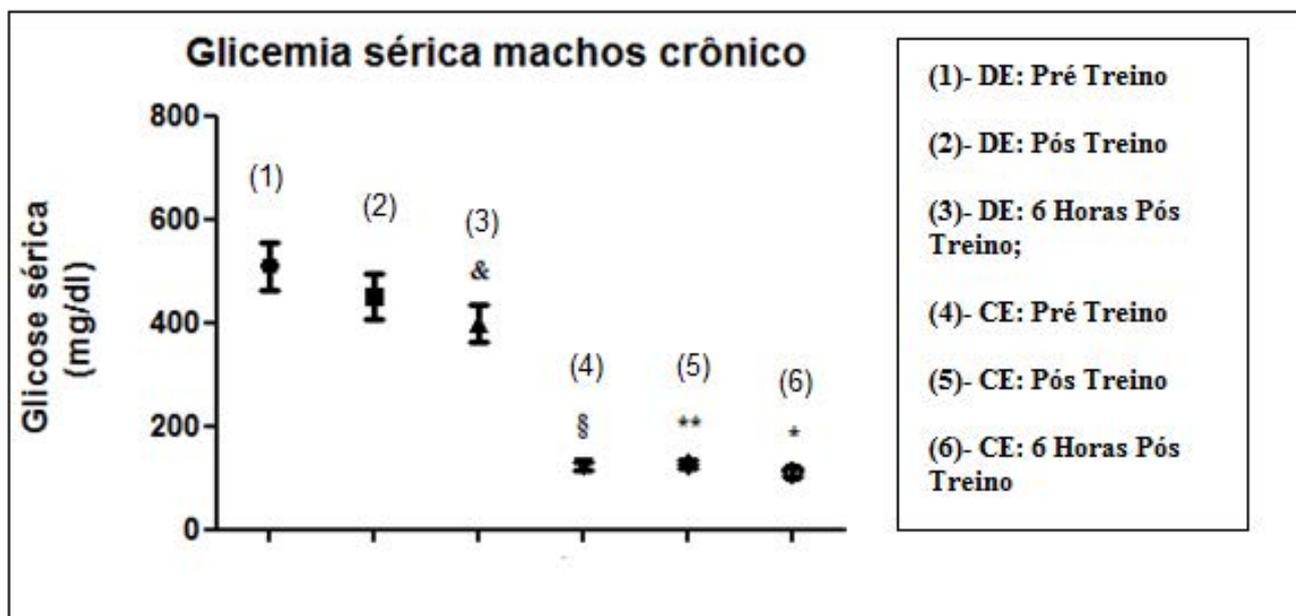


Figura 6: Demonstrativo de glicemia sérica de ratos diabéticos expostos a um protocolo de exercício anaeróbico em meio líquido de 6 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM; &  $p < 0,001$  para DE 6 HORAS vs. DE PRÉ e DE PÓS; §  $p < 0,0001$  para CE PRÉ vs. DE PRÉ, DE PÓS e DE 6 HORAS; \*\*  $p < 0,0001$  para CE PÓS vs. DE PRÉ, DE PÓS e DE 6 HORAS; \*  $p < 0,0001$  para CE 6 HORAS vs. DE PRÉ, DE PÓS e DE 6 HORAS. Valores expressos

mediante aplicação de teste estatístico para análise paramétrica – ANOVA One-way com pós teste de Newman Keulls,  $p < 0,05$ .

Na Figura 7, a poliúria (excesso de urina excretada) foi comprovada com diferença entre os grupos DEC e DSC em relação aos grupos CEC e CSC com  $p < 0,0054$ . O treinamento, entretanto, não alterou tais variáveis entre os grupos DEC e DSC. Os dados determinam que o treinamento foi eficaz em reduzir a glicosúria, fato corroborado pela análise de glicemia sérica previamente descrita. Demais parâmetros como cetona e urobilinogênio permaneceram dentro de uma faixa de normalidade intergrupos com exceção dos eritrócitos que se mostraram elevados no grupo DEC. A bilirrubina se mostrou inalterada entre os grupos DEC e CSC, porém, os dados ratificam alterações nos grupos DSC e CEC. Os animais DSC obtiveram menores valores na concentração de nitrito excretada, enquanto que os demais grupos quase não obtiveram alterações. Em relação aos níveis de proteína, o grupo DEC apresentou elevações em relação aos demais grupos. Os grupos exercitados (DEC e CEC) manifestaram menores concentrações de leucócitos em relação aos grupos sedentários (dados não apresentados).

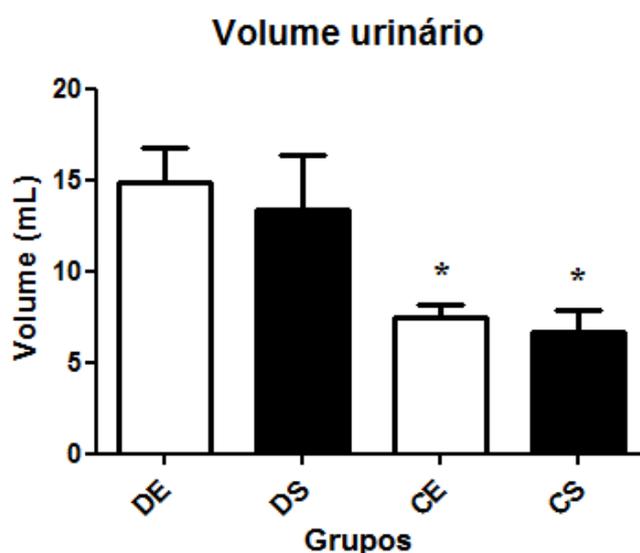


Figura 7: Demonstrativo de urina excretada ao final de 6 semanas de treinamento anaeróbio em meio líquido após 24 horas de isolamento em gaiola metabólica. Para significância estatística consideramos  $p$  inferior a 5%. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,0054$  para CS vs. DE, DS; CE vs. DE, DS.

Não houve alteração na expressão do gene *Prkaa2* que codifica a proteína cinase ativada por AMP (AMPK $\alpha$ 2) após 24 horas da última sessão de treino em nenhum grupo observado (Figura 8).

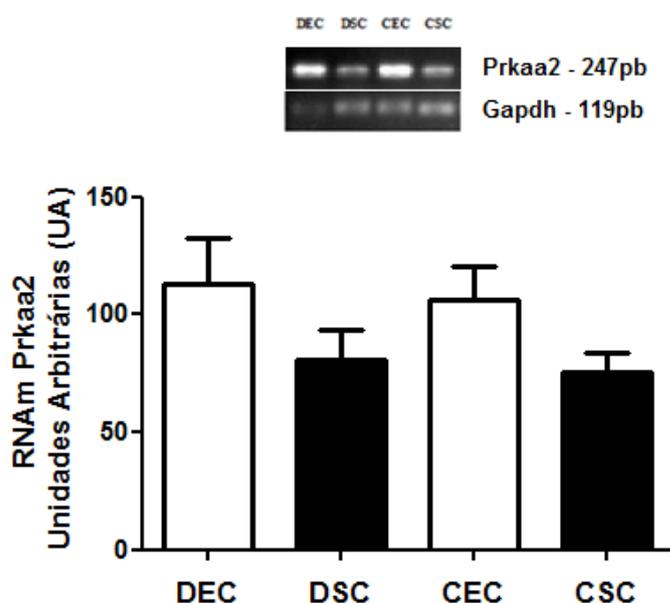


Figura 8: Demonstrativo de expressão gênica em Unidades Arbitrárias (UA) do gene decodificador da proteína *Prkaa2*, gene *Prkaa2*, no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos e controles expostos a treino anaeróbio de 6 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. DEC  $n=6$ ; DSC  $n=6$ ; CEC  $n=6$  e CSC  $n=6$ .

Na Figura 9, observa-se o padrão de expressão do gene *Slc2a4* após realização de exercício crônico. O salto em meio aquático cronicamente

realizado pelos diabéticos (DEC) causou aumento na expressão do Slc2a4 comparado ao grupo que não realizou o exercício (DSC) (\* $p < 0,0484$  para DSC vs DEC).

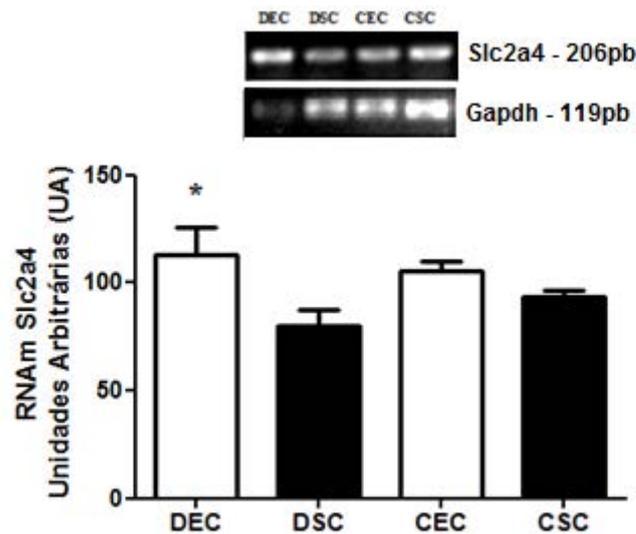


Figura 9 - Conteúdo de expressão gênica expresso em Unidades Arbitrárias (UA) do gene que codifica a proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4), o Slc2a4 em músculo gastrocnêmio de ratos Wistar diabéticos e controles expostos ao treinamento crônico anaeróbio de 6 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,0484$  para DSC (n= 5) vs. DEC (n=5).

Em contrapartida, biomarcadores de proteólise como a isoforma da Ubiquitina (Ubiquitina B) UBb apresentou alterações gênicas significantes no músculo gastrocnêmio em comparação com animais sedentários (Figura 10), sendo,  $p < 0,05$  para diabéticos sedentários comparados aos seus respectivos controles sedentários (DSC e CSC) que apresentaram valores

substanciais de expressão bem mais elevados. O mesmo comportamento pode ser observado quando comparamos os animais controles exercitados (CEC) aos grupos sedentários.

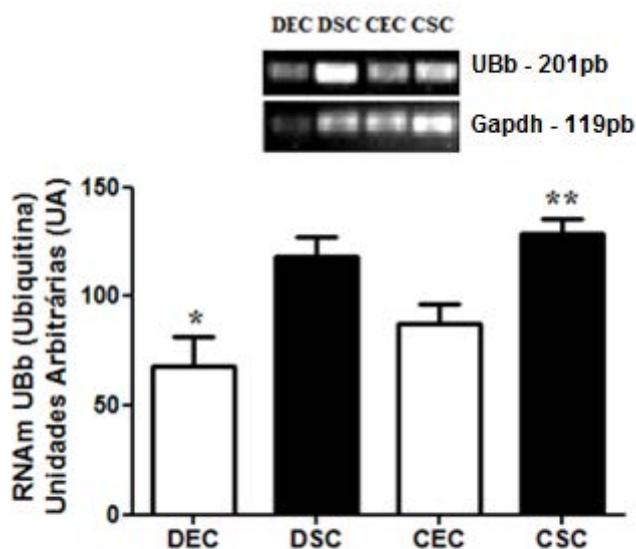


Figura 10: Demonstrativo de expressão gênica (Unidades Arbitrárias) do gene decodificador da Ubiquitina B, Ubb, em músculo gastrocnêmio de ratos wistar expostos a um protocolo de treino anaeróbio em meio líquido durante 6 semanas. \*  $p < 0,05$  para DEC (n= 5) vs. DSC (n= 5) e CSC (n= 5); \*\* $p < 0,05$  para CEC (n= 6) vs. DSC e CSC.

A enzima de conjugação E<sub>2</sub>14kDa considerada marcador sumário da via proteolítica ubiquitina-proteassoma apresentou significativas alterações em relação aos grupos sedentários que demonstraram níveis mais elevados de expressão gênica do gene decodificador desta proteína, sendo,  $p < 0,05$  para DEC vs DSC e CSC (Figura 11).

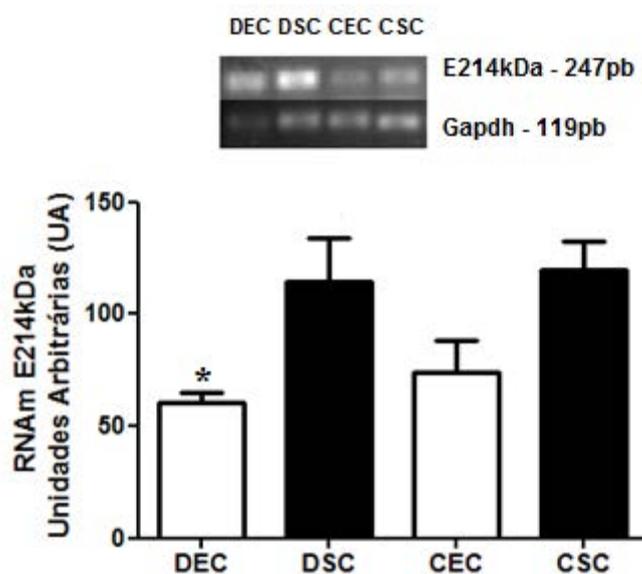


Figura 11: Demonstrativo de expressão gênica (Unidades Arbitrárias) do gene decodificador da enzima de conjugação E<sub>214</sub>kDa no músculo gastrocnêmio de ratos wistar diabéticos e controle expostos a um protocolo de treino anaeróbio em meio líquido durante 6 semanas. \*  $p < 0,05$  para DEC (n= 5) vs. DSC (n= 6) e CSC (n= 6). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão.

O treinamento surtiu alterações significativas em expressão do gene que codifica a proteína MuRF-1 (MuscleRingFinger), Trim63, na musculatura apresentando padrão comportamental para sedentários com maiores níveis de expressão comparadas aos exercitados (Figura 12), sendo,  $p < 0,0191$  para DSC comparado aos demais grupos (DEC, CEC e CSC). Os maiores níveis apresentados pelo grupo DSC comprovam a eficácia do DM em ativar a via ubiquitina-proteassoma em modelos de diabetes mellitus bem instalado e sem o tratamento insulínico e/ou acompanhamento devido de um

profissional em educação física para monitorar um programa de treinamento adequado.

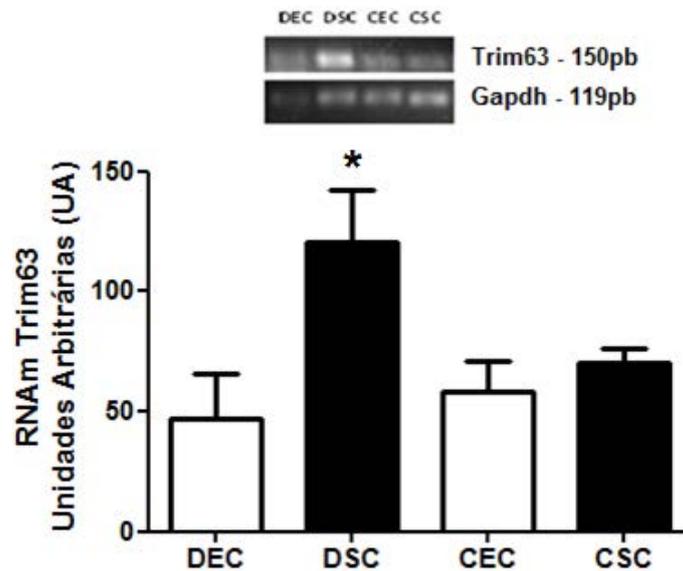


Figura 12: Demonstrativo de expressão gênica expresso em Unidades Arbitrárias (UA) do gene decodificador da proteína MuRF-1 (Muscle Ring Finger) no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar diabéticos e controles expostos a um protocolo de treinamento anaeróbio em meio líquido durante 6 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,0191$  para DSC (n= 6) vs. DEC (n= 5), CEC (n= 7) e CSC (n= 6).

Não foram constadas diferenças significativas nos níveis de expressão gênica do Fator Nuclear kappa B (NFkB) em nenhum grupo observado (Figura 13).

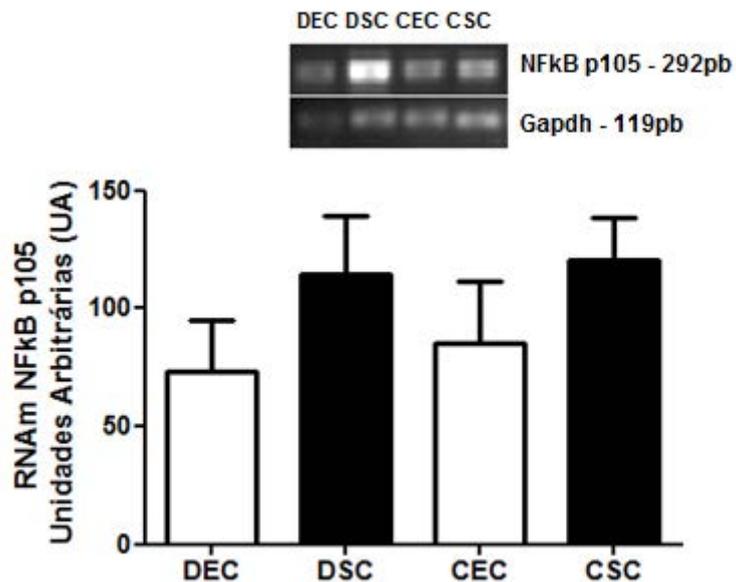


Figura 13: Demonstrativo de expressão gênica do Fator Nuclear κB subunidade p105 no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos e controles expostos a um treinamento anaeróbio de 6 semanas em meio líquido. Valores expressos em média ± erro padrão.

Em relação ao conteúdo proteico de GLUT4 (Transportador de Glicose 4), constatamos aumentos significativos no grupo CEC com  $p < 0,05$  em comparação aos demais grupos (Figura 14), tal observação corrobora a importância da prática regular de exercício físico para melhorar o perfil metabólico em estruturas celulares. Entretanto, não constatamos melhoras deste parâmetro no grupo diabético exercício.

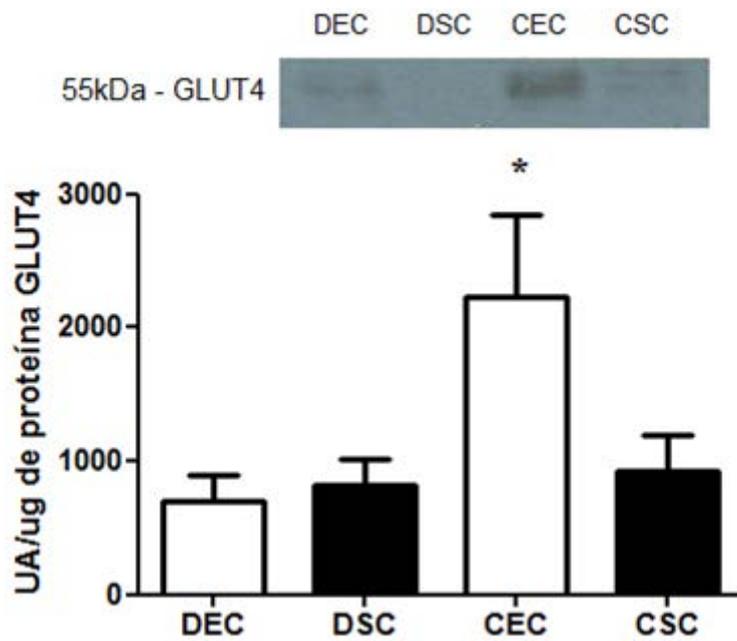


Figura 14: “Imunoblotting” – imagem típica de um ensaio de Western Blotting – ECL. Conteúdo proteico de GLUT4 em membranas totais, sendo, \* $p < 0,05$  para CEC vs. DEC, onde DEC  $n=5$ , DSC  $n= 4$ , CEC  $n= 5$  e CSC  $n= 5$ .

## 6. DISCUSSÃO

O exercício é um componente importante na melhoria dos sintomas deletérios do diabetes mellitus (DM) em virtude de um sistema complexo de adaptações estruturais que incluem melhora da sensibilidade à insulina, perfil glicêmico, redução da pressão arterial e risco global de doenças cardiovasculares e deve ser considerado como método para tratamento desta doença (BELOTTO, 2010, KIM, 2011, REYNA, 2013).

Este estudo demonstra que mesmo em exposições em curto e longo prazo ao diabetes mellitus insulino-dependente e sem o tratamento insulínico adequado os animais manifestaram considerável perda de peso. Tal informação pode ser corroborada pela hipoinsulinemia decorrente desta doença, levando a um estado catabólico de proteínas e gorduras. Outro fator contribuinte e ratificado neste estudo está na excreção de glicose (glicosúria) associada à poliúria, (MOURA et al., 2012). Neste trabalho observamos melhora na captação de glicose pós treino em um período de 6 horas de intervenção, tal alteração se deve ao estado estável de adaptação ao exercício com conseqüente mobilização de proteínas intracelulares relacionadas ao metabolismo celular (Slc2a4) e efeito EPOC (Consumo de Oxigênio Pós exercício).

Foi possível observar redução significativa na concentração de glicose sérica em comparação com animais diabéticos pré- e pós-treinamento (CAO, 2010), além de elevada glicemia como esperado em relação aos controles. A redução da glicemia nestas condições possui respaldo na maior captação de glicose pelos tecidos periféricos durante prática de treinamento tanto agudo quanto crônico, (ROGATTO, 2004) o estresse muscular ocasiona

ativação de proteínas intracelulares como a AMPK que estimulada atua em vias bioquímicas de captação de glicose e oxidação de ácidos graxos (PALACIOS, 2009; LIRA, 2007). Estudos recentes abordam a ativação de Akt/PI3k induzida por AMPK, bem como inibição da via mTOR/S6K in vitro (TAO, 2010) consideradas vias bioquímicas que desempenham um papel central no metabolismo celular. Aumentos do fluxo sanguíneo advindos do treinamento físico promovem melhoria no *turnover* de IR (Receptor de Insulina), conseqüentemente a interação bioquímica de IR com proteínas citosólicas tais como PI3-kinase que ativam a translocação de mais transportadores específicos de glicose, atuando diretamente na captação. (GOMES, 2009; HAWLEY, 2008). Treinos de caráter agudo estimulam o ganho de massa livre de gordura que propicia melhor captação de glicose e maior capacidade de armazenamento e depleção dos estoques de glicogênio intracelulares (ZANUSO, 2010). Os animais controle, por sua vez, não obtiveram diferenças significativas em nenhum momento observado.

O treinamento nesse sentido exerceu efeito hipoglicemiante constatado em diversos estudos com modelos experimentais e clínicos de diabetes (LAHAYE, 2010; HUSSEY et al., 2012), porém, poucos trabalhos têm focado em protocolos de treinamento anaeróbio de caráter crônico, sendo muitos projetos direcionados a programas de treinamento em exercícios aeróbios ou combinados (aeróbio + resistido) (BELOTTO, 2010; LAHAYE, 2010, LIANG, 2012) sendo de suma importância a investigação minuciosa de tais intervenções sobre o perfil glicêmico e mecanismos fisiológicos que norteiam a melhora do quadro deletério do DM. Neste estudo verificamos que o treinamento de 06 semanas ocasionou melhora significativa na sensibilidade à

insulina (Fig. 3), o que estão de acordo com o observado por Hall et al., (2013) que apontaram melhoras substanciais na sensibilidade à insulina em ratos diabéticos através de um protocolo de treino resistido de 6 semanas.

Como o músculo gastrocnêmio é formado por um tipo de fibra mais prevalente à massa muscular total e representar de forma genérica ambas unidades motoras glicolítica e oxidativa, ele foi escolhido para ser avaliado em nosso estudo. Assim objetivou-se analisar o impacto do treinamento anaeróbio sob biomarcadores de proteólise na musculatura oxidativa-glicolítica (gastrocnêmio) em modelos experimentais; tendo em vista o aumento da ativação de proteínas proteolíticas já elucidadas na literatura: UbB, E<sub>2</sub>14kDa, MuRF-1, MAFbx/Atrogin1 e subunidades do proteossoma como a PSMB4 em modelos de diabetes (RAZEGHI, 2006; CHEN, 2011). Constatamos redução significativa na expressão gênica de fatores bioquímicos proteolíticos (MuRF-1, UBb e E<sub>2</sub>14kDa) ratificando, assim, a importância do treino como método terapêutico não-farmacológico na inibição do *breakdown* proteico miofibrilar. Em protocolos de treinamento crônico anaeróbio para hipertrofia em modelos experimentais foram constatadas reduções significativas nas expressões gênicas de MuRF-1 e Atrogin1 no músculo plantar de ratas saudáveis e jejuadas no grupo treinado (ZANCHI, 2009). Sabe-se que os heterodímeros p50/p65 (NF-κB) se ligam a regiões promotoras da MuRF-1 no DNA induzindo a expressão desta e consequente degradação proteica, (PLANT et al., 2010; GLASS, 2005). Entretanto, verificamos a expressão gênica da subunidade p105 considerada potencializadora da translocação do NF-κB ao núcleo e não constatamos diferença significativa nestes níveis após 24 horas da última sessão de treino, entretanto,

consideramos tal efeito advindo do pico de expressão gênica pós treino do NFkB, uma vez que analisamos o conteúdo de RNAm responsável pela posterior síntese proteica desta estrutura. Informações concernentes à expressão gênica afirmam que após 3-12 horas de contração muscular de alta intensidade ocorrem respostas celulares referentes à transcrição gênica retornando a níveis basais com 24 horas, (ZANCHI, et al, 2009).

CHEN et al., (2011), analisaram os efeitos de 8 semanas de exercício aeróbio sobre a expressão de MuRF-1 em ratos wistar e constataram que há redução na expressão gênica deste gene devido à redução do estresse oxidativo proporcionada pelo treinamento. Em contraste, o estresse oxidativo promove desequilíbrio de proteínas e enzimas que interferem na regulação de fatores chave para a homeostase celular. A liberação de ROS direciona as células musculares para um ciclo catabólico que leva à degradação muscular, bem como ativa a via bioquímica do Fator Nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) interferindo diretamente na transcrição gênica de genes fundamentais para o metabolismo celular. (LENK, SCHULER e ADAMS 2010, YAMAMOTO e GAYNOR, 2001). Além disso, o estresse oxidativo desempenha um papel chave na potencialização de anormalidades geradas pelo diabetes, visto que a hiperglicemia na presença de radicais livres acarreta em autoxidação de glicose e glicação proteica (WAYHS, 2010). O metabolismo da aloxana promove geração intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio) que aliados ao diabetes potencializam o estresse oxidativo (CERETTA, 2012, COUGHLAN, 2009). Em estudos realizados por Zhengtang, (2011), o exercício foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo e melhorar a captação de oxigênio; uma vez que o estresse oxidativo possui relação direta com a resistência a

insulina induzida por hiperglicemia, inibindo o aumento do transportador de glicose GLUT4, a síntese de glicogênio e a fosforilação de fatores chave como IR, Akt e GSK3 $\beta$ .

Estudos recentes apontam a interação entre isoformas específicas de PGC-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ 4) na regulação de vias da miostatina e IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) na musculatura esquelética de ratos, ambas reguladoras do tamanho e força musculares, (RUAS, 2012). Constatamos ganho de massa muscular nos modelos experimentais apresentados neste trabalho e consideramos de sumária importância a análise minuciosa de parâmetros relacionados à biogênese mitocondrial como informação potencializadora de nossos achados, uma vez que o PGC-1 $\alpha$  também suprime fatores transcricionais da família de proteínas Forkhead incluindo FoxO3 que se ligam a regiões promotoras de Atrogin-1. O efeito protetor do PGC-1 $\alpha$ , além disso, está no bloqueio da indução ou ação de genes específicos de atrofia muscular, (SANDRI, et al., 2006).

Entretanto, mediante quantificação proteica (Western Blotting) observamos reduções significativas no conteúdo proteico de proteína transportadora de glicose (GLUT4) dos animais diabéticos em relação aos animais controle. A dificuldade de síntese protéica pode ser explicada pela ação de citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 que interagem bioquimicamente com o receptor específico de membrana (IR) e receptores Toll-like (Toll Like Receptors – TLR's), ocasionando fosforilação da subunidade catalítica  $\beta$  do receptor IR e seus substratos, principalmente, IRS-1 em resíduos de serina o qual desativa proteínas chave para continuidade da

cascata de sinalização do GLUT4 e sua posterior translocação para a membrana, (KARAGOUNIS, et al, 2010).

Este resultado associado pode explicar os valores de glicemia pós-treino e 6 horas pós-treino, os quais foram reduzidos tanto no exercício agudo quanto no crônico, evidenciando a importância desta ferramenta ser utilizada por indivíduos diabéticos. Ressalta-se que nos animais crônicos foi observada a manutenção de glicemia reduzida mesmo até 6 horas pós-treino comparada com o momento pré. Por outro lado, agudamente não se observou esta manutenção (dados obtidos em nosso laboratório e ainda não publicados) e sim um retorno da glicemia a valor pré-treino, sugerindo que quando praticado agudamente, o exercício já exerce seu efeito positivo sobre a captação de glicose, porém ele é muito mais eficiente se mantido nos indivíduos diabéticos em longo prazo.

## 7. CONCLUSÃO

Diante do exposto nossos estudos apontam melhorias na captação de glicose por meio de protocolo com carga fixa em perfil glicêmico e massa muscular medida em gramas em modelos experimentais de diabetes. Entretanto, o campo científico é escasso em trabalhos com treinamento resistido no que tange à avaliação de parâmetros fisiológicos em modelos de DM, no qual nos encontramos encorajados a explorar outras vertentes dentro do leque de alternativas, no que diz respeito a protocolos de treino intermitentes de intensidade leve, moderada e/ou alta. O treinamento foi benéfico em promover melhorias circunstanciais em animais expostos cronicamente ao exercício, apesar da necessidade de análise de proteínas diretamente relacionadas ao metabolismo celular, biogênese mitocondrial e fatores transcricionais que podem potencializar nossas análises e facilitar estudos que viabilizem protocolos mais eficientes de treino resistido que ainda permanece inconsistente na literatura.

## 8. ANEXOS

**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Presidente Prudente

Presidente Prudente, 11 de abril de 2012.

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Rogério de Oliveira Batista.**

Ref. Projeto intitulado: "Efeitos do exercício físico de salto sobre as proteínas relacionadas à captação de glicose, via proteolítica dependente de ATP e biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por administração de aloxana", sob orientação do (a) Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim.

**Protocolo nº 02/2012**

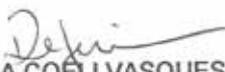
Recebemos o projeto, o qual foi examinado pelo relator, tendo recebido o parecer anexo.

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

Diante do cronograma do desenvolvimento da pesquisa, fica estabelecido o seguinte prazo: até a última terça-feira útil do mês de **Outubro de 2014** para entrega de **um relatório final sucinto** à CEUA (vide modelo na página da FCT).

Informamos que eventuais emendas (proposta de modificação no projeto inicial) e extensões (proposta de prorrogação ou continuidade da pesquisa) devem ser apresentadas à CEUA de forma clara e sucinta em duas vias impressas, identificando a parte do protocolo a ser modificado e suas justificativas. Entretanto, se houver modificações importantes de objetivos e métodos deve ser apresentado outro protocolo de pesquisa.

Atenciosamente,



PROFA. DRA. REGINA COELI VASQUES DE MIRANDA  
COORDENADORA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Presidente Prudente, 11 de abril de 2012.

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Rogério de Oliveira Batista.**

Ref. Projeto intitulado: "Efeitos do exercício físico de salto sobre as proteínas relacionadas à captação de glicose, via proteolítica dependente de ATP e biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por administração de aloxana", sob orientação do (a) Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim.

**Protocolo nº 02/2012**

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

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

Diante do cronograma do desenvolvimento da pesquisa, fica estabelecido o seguinte prazo: até a última terça-feira útil do mês de **Outubro de 2014** para entrega de **um relatório final sucinto** à CEUA (vide modelo na página da FCT).

Informamos que eventuais emendas (proposta de modificação no projeto inicial) e extensões (proposta de prorrogação ou continuidade da pesquisa) devem ser apresentadas à CEUA de forma clara e sucinta em duas vias impressas, identificando a parte do protocolo a ser modificado e suas justificativas. Entretanto, se houver modificações importantes de objetivos e métodos deve ser apresentado outro protocolo de pesquisa.

Atenciosamente,

  
PROFA. DRA. REGINA COELI VASQUES DE MIRANDA  
COORDENADORA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER**

Em atenção à solicitação de aprovação do Protocolo nº 02/2012 (segundo as normas de utilização de ratos de laboratório pautadas por esta Comissão de Ética local), os responsáveis diretos da pesquisa intitulada "**Efeitos do exercício físico de salto sobre as proteínas relacionadas à captação de glicose, via proteolítica dependente de ATP e biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por administração de aloxana**", comprovaram – na com toda documentação pertinente. Observei que os animais, a princípio, não sofrerão dor embora haja estresse por práticas de atividade aeróbica, ainda que esta condição não seja intencional. Vale ressaltar que o procedimento de eutanásia, por injeção anestésica, tem base em critérios científicos aprovados em pesquisas desta natureza. Por conseguinte, considero viável a **aprovação** deste trabalho junto à esta Comissão.

## REFERÊNCIAS

- AL-JARRAH, M., Exercise training prevents endometrial hyperplasia and biomarkers for endometrial cancer in rat model of type 1 diabetes, **J Clin Med Res** – Jordan, v. 2, n. 5, p. 207-214, 2010.
- ALVES, L.C., et al., A influência das doenças crônicas na capacidade funcional dos idosos do Município de São Paulo, Brasil, **Cad. Saúde Pública** – Rio de Janeiro, v. 23, n. 38, p. 1924-1930, ago., 2007.
- ALVEZ, M. et al., Increased expression of advanced glycation end-products and their receptors, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats, **Diabetologia** – Campinas, v. 48, p. 2675-2681, 2005.
- AUSTIN, S., et al, Impact of PGC-1 $\alpha$  on the topology and rate of superoxide production by the mitochondrial electron transport chain, **Free Radical and Biology Medicine** – Montreal, 2011.
- BELOTTO, M.F., et al., Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes, **Clinical and Experimental Immunology** – São Paulo, v. 162, p. 237-243, 2010.
- CAO, S., et al., Effects of exercise on expression and phosphorylation of PI3K in insulin signaling in the skeletal muscles of type 2 diabetic rats. **J South Med Univ** – Shenyang (China), v. 30, n. 6, p. 1217-1221, January, 2010.
- CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A., Vias de sinalização da insulina, **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica** - Campinas, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago., 2002.
- CERETTA, LB, et al., Increased oxidative-stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats, **Experimental Diabetes Research** – Criciúma, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- CHEN, G., et al., Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes, **Life Sciences** – China, v. 89, p. 44-49, 2011
- CHEN, Q, et al., Insulin alleviates degradation of skeletal muscle protein by inhibiting the ubiquitine-proteasome system in septic rats, **Journal of Inflammation** – Nanjing, v. 8, n. 13, p. 1-8, 2011.
- CIECHANOVER, A., et al., The ubiquitin-proteasome pathway: on a protein death and cell life, **The EM BO Journal** – Haifa, v. 17, n. 24, p. 7151-7160, 1998.

CIOLAC, E.G., GUIMARÃES, G.V., Exercício físico e síndrome metabólica, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** - São Paulo, v. 10, n. 4, p. 319-324, jul./ago. 2004.

COLBERG, Sheri R. **Atividade física e diabetes**. São Paulo: Manole, 2003.

COUGHLAN, M.T., et al., RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes, **Journal of American Society of Nephrology** – Melbourne, v. 20, p. 742-752, 2009.

FREITAS, H.S., et al., Acute and short-term insulin-induced molecular adaptations of GLUT2 gene expression in the renal cortex of diabetic rats, **Molecular and Cellular Endocrinology** – São Paulo, v. 237, p. 49-57, feb./mar., 2005.

GAZOLA, V.A.F.G., BAZOTTE, R.B., SOUZA, S.V., A atividade física no tratamento de pacientes portadores de diabetes mellitus, **Arquivo Ciência e Saúde**, v. 5, n. 1, p. 25-31, jan./abr., 2001.

GLASS, DJ., Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways, **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** – Tarrytown, v. 37, p. 1974-1984, 2005.

GOMES, P.R.L., Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a expressão de GLUT4 em ratas prenhes e lactantes e sua prole, 2010, 69f. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Universidade Estadual Paulista – UNESP.

GOMES, R.J., et al., Growth factors and glucose homeostasis in diabetic-rats: effects of exercise training, **Cell Biochemistry and Function** – Rio Claro, v. 27, p. 199-204, 2009.

HALL, KE et al., The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents, **Metabolism Clinical and Experimental** – Ontario, 2013.

HARDIE, D.G., Minireview: The AMP-Activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status, **Endocrinology** – Scotland, v. 144, n. 12, p. 5179-5183, 2003.

HARDIE, D.G., SAKAMOTO, K., AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle, **Physiology** – Scotland, v. 21, p. 48-60, 2006.

HASSELGREN, PO, FISCHER, JE, The Ubiquitin-Proteasome Pathway, **Annals of Surgery** – Ohio, v. 225, n. 3, p. 307-316, 1999.

HAWLEY, J.A., LESSARD, S.J., Exercise training-induced improvements in insulin action, **Acta Physiologica** – Oxford, v. 1, n. 192, p. 127-135, 2008.

HOBLER, S. et al., Sepsis is associated with increased ubiquitin-conjugating enzyme E2<sub>14k</sub> mRNA in skeletal muscle, **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 276, p. R468-R473, 1999.

HUSSEY, SE, et al., Exercise increases skeletal muscle GLUT4 gene expression in patients with type 2 diabetes, **Diabetes, Obesity and Metabolism** – Melbourne, v. 14, n. 8, p. 768-771, august, 2012.

HWANG, I.K. et al., Differential effects of treadmill exercise in early and chronic diabetic stages on Parvalbumin Immunoreactivity in the hippocampus of a rat model of type 2 diabetes. **Neurochemical Research** – Seoul, v. 36, p. 1526-1532, 2011.

IRIGOYEN, M.C. et al., Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 109-117, 2003.

JAMART, C., et al., Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running, **J ApplPhysiol** – Saint-Etienne, fevereiro, p. 1-25, 2012.

JESSEN, N., GOODYEAR, L.J., Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle, **J. Appl. Physiol** – Boston, v. 99, p. 330-337, 2005.

KARAGOUNIS, LG, et al., Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and Akt-mediated signaling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle, **Eur J Applied Physiol** – Bundoora, v. 109, p. 839-848, 2010.

KIM, S.S., et al., Exercise training and selenium or a combined treatment ameliorates aberrant expression of glucose and lactate metabolic proteins in skeletal muscle in a rodent model of diabetes, **Nutrition Research and Practice** – Seoul, v. 5, n. 3, p. 205-213, 2011.

LAHAYE, S.D., Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac  $\beta$ -adrenoceptors in diabetic rats, **Cardiovascular Diabetology** – Rennes (France), v. 9, n. 72, p. 1-9, 2010.

LENK, K., SCHULER, G. e ADAMS, V., Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training, **J Cachexia Sarcopenia Muscle** – Germany, v. 1, p. 9-21, 2010.

LIANG, Y., et al., Exercise-induced galanin release facilitated GLUT4 translocation in adipocytes of type 2 diabetic rats, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Yangzhou, v. 100, p. 554-559, 2012.

LIN, S, et al., Activation of ubiquitine-proteasome pathway is involved in skeletal muscle wasting in a rat model with biliary cirrhosis: a potencial role of TNF- $\alpha$ , **Am J Physiol Endocrinol Metab** – Taipei, v. 288, E493-E501, 2005

LIRA, VA., et al., Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle, **Am J Physiol Endocrinol Metab** – Florida, v. 293, E1062-E1068, 2007.

MATHIAS, T.A.F., JORGE, M.H.P.M., Diabetes mellitus na população idosa em município da região sul do Brasil: um estudo da mortalidade e morbidade hospitalar, **Arq. Bras.Endocrinol.Metab.** – Maringá, v. 48, n. 4, p. 505-512, ago, 2004.

MEUSSER, B., et al., ERAD: The long road to destruction, **Nature Cell Biology** – Berlin, v. 7, n. 8, agosto, p. 766-772, 2005.

MONTEIRO, L.Z., et al., Conhecimento profissional de educação física frente à atuação com portadores de diabetes mellitus nas academias de ginástica de Fortaleza, **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte** – São Paulo, v. 23, n. 2, p.- 135-142, abr/jun, 2009.

MORO, A.R.P., et al., Effect of combined and aerobic training on glycemic control in type 2 diabetes. *Fisioterap. Mov.* – Curitiba, v. 25, n. 2, p. 399-409, abr/jun. 2012.

MOURA, LP, et al., Spirulina, exercício e controle da glicemia em ratos diabéticos, **Arq Bras Endocrinol Metab** – Rio Claro, v. 56, n. 1, janeiro, p. 25-32, 2012

NAM, S.M., et., Differential effects of treadmill exercise on cyclooxygenase-2 in the rat hippocampus at early and chronic stages of diabetes. **Laboratory Animal Research** – Seoul, v. 27, n. 3, p. 189-195, August, 2011.

NOGUEIRA, L., et al., The NFκB pathway: a therapeutic target in glioblastoma, **Oncotarget** – Spain, v. 2, n. 8, setembro, p. 646-653, 2011.

NORRBOM, J., et al, Alternative splice variant PGC-1α-b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle, **Am J Physiol Metab** – Stockholm, Agosto, 2011.

OJUKA, E.O., et al., Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca<sup>2+</sup>, **J Physiol Endocrinol Metab** – Washington, v. 282, p. E1008-E1013, may, 2002.

ORIAN, A., et al., Ubiquitin-mediated processing of NFκB transcriptional activator precursor p105, **The Journal of Biology Chemistry** – Missouri, v. 270, n. 37, p. 21707-21714, 1995.

PÁDUA, M.F., et al., Exercício Físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** – Campinas, v. 15, n. 3, p. 179-184, mai/jun, 2009.

PALACIOS, OM, et al., Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1α in skeletal muscle, **AGING** – Houston, v. 1, n. 9, p. 771-783, September, 2009

PATTI, M.R., et al, Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potencial role of PGC1 and NRF1, **PNAS** – Boston, v. 100, n. 14, p. 8466-8471, july, 2003.

PAULI, J.R. et al., Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético, **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 53, n. 4, p. 399-406, 2009.

PLANT, JP et al., Cellular Markers of Muscle Atrophy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** – Toronto, v. 42, p. 461-471, 2010.

RAZEGHI, P, et al., Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart, **Biochemical and Biophysical Research Communications** - Houston, v. 342, p. 361-364, 2006.

REYNA, S.M., et al., Short-term exercise training improves insulin sensitivity but does not inhibit inflammatory pathways in immune cells from insulin-resistant subjects, **Journal of Diabetes Research** – San Antonio, p. 1-8, 2013.

RIBEIRO, C. et al., Muscle protein metabolism in neonatal alloxan-administered rats: effects of continuous and intermittent swimming training, **Diabetology and Metabolic Syndrome** – São Paulo, v. 4, n. 5, p. 1-31, February, 2012.

ROGATTO, GP, et al. Respostas metabólicas agudas de ratos wistar ao exercício intermitente de saltos, **Motriz** – Rio Claro, v. 10, n. 2, p. 61-66, maio/agosto, 2004

ROPELLE, E.R., PAULI, J.R., CARVALHEIRA, J.B.C., Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica, **Motriz**, Rio Claro, v. 11, n. 1, p. 49-55, jan./abr. 2005.

RUAS, JL., et. al. A PGC-1 $\alpha$  Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy, **Cell** – Boston, v. 151, p. 1319-1331, 2012.

RUTTEN, E., et al., Greater whole-body myofibrillar protein breakdown in cachectic patients with chronic obstructive pulmonar disease, **Am J Clin Nutr** – Maastricht, v. 83, n. 829, 2006

SANDRI, M., PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription, **PNAS** – Michigan, v. 103, n. 44, p. 16260-16265, October, 2006.

SERAPHIM, PM. A resistência à insulina reduz a expressão do gene do GLUT4 na presença e na ausência da obesidade. 2004. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, C. A.; LIMA, W. C. Efeito benéfico do exercício físico no controle metabólico do diabetes mellitus tipo 2 à curto prazo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 550-556, out. 2002.

SILVA, KE, et al., Perfil metabólico de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico, **Motriz**, Rio Claro, v. 10, n. 3, p. 189-193, set/dez., 2004.

SILVA, J. et al., NF- $\kappa$ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- $\alpha$  involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle, **Molecular and Cellular Endocrinology** – São Paulo, v. 240, p. 82-93, 2005.

SIXT, S.; KORFF, N.; SCHULER, G. *et al.* Opções terapêuticas atuais para diabetes mellitus tipo 2 e doença arterial coronariana: prevenção secundária intensiva focada no treinamento físico versus revascularização percutânea ou cirúrgica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 3, p.220-223, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus, **Revista DIRETRIZES**, p. 1-168, 2007

SOUZA, R.A.P., Qualidade de vida relacionada à saúde, controle glicêmico e seus determinantes em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, 2008, 143f. Dissertação, (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

STEEMBURGO, T., et al, Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito, **Arq Bras Endocrinol Metab** – Porto Alegre, v. 53, n. 5, jun, p. 497-508, 2009.

TAO, R., et al., AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway, **Journal of Molecular Signaling** – Boston, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2010.

TAVARES, D.M.S., DRUMOND, F.R., PEREIRA, G.A., Condições de saúde de idosos com diabetes no município de Uberaba, Minas Gerais, **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, vol. 17, nº 2, p. 342-349, abr/jun, 2008.

TAVARES, D.M.S., RODRIGUES, F.R., SILVA, C.G.C., MIRANZI, S.S.C., Caracterização de idosos diabéticos atendidos na atenção secundária, **Ciência e Saúde Coletiva** – Uberaba, v. 12, n. 5, p. 1341-1352, 2007.

TUOMILEHTO, M.D.J. et al., Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance – Massachusetts, v. 344, n. 18, p. 1343-50, maio, 2001.

VAUGHAN, S., JAT, PS., Deciphering the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in cellular senescence, **AGING** – London, v. 3, n. 10, p. 913-919, Outubro, 2011.

WAYHS, C.A.Y., et al., Effects of insulin and clonazepam on DNA damage in diabetic rats submitted to the forced swimming test, **Mutation Research** – Porto Alegre, v. 703, p. 187-190, 2010.

YAMAMOTO, Y., GAYNOR, R.B., Role of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States, **Current Molecular Medicine** – Dallas, v. 1, n. 3, p. 287-296, 2001.

YANG, S, et al., Changes in three types of ubiquitin mRNA and Ubiquitin-protein conjugate level during lens development, **Exp Eye Res** – New Jersey, v. 74, p. 595-604, 2002.

ZANCHI, N.E. et al, Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 $\beta$  and p70S6K levels in rats, **European Journal Applied Physiology** – São Paulo, v. 106, p415-423, 2009.

ZANUSO, S., et al., Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence, **Acta Diabetologia** – Padua, v. 47, p. 15-22, 2010.

ZHENG TANG, Q., et al., Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats, **Free Radical Biology and Medicine** – Shanghai, v. 50, p. 794-800, 2011.

WAYHS, C.A.Y., et al., Effects of insulin and clonazepam on DNA damage in diabetic rats submitted to the forced swimming test, **Mutation Research** – Porto Alegre, v. 703, p. 187-190, 2010.