

Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências

Campus de Rio Claro

Tese de Doutorado

**PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA
PROTEÍNA ROCK EM CAMUNDONGOS OBESOS: EFEITOS
SOBRE A SINALIZAÇÃO DA INSULINA E HOMEOSTASE DA
GLICOSE**

***ROLE OF PHYSICAL EXERCISE IN REGULATION OF ROCK
PROTEIN IN OBESE MICE: EFFECTS ON INSULIN SIGNALLING
AND GLUCOSE HOMEOSTASIS***

José Rodrigo Pauli
Pesquisador Responsável

Leandro Pereira de Moura
Candidato

Rio Claro

Estado de São Paulo - Brasil

Abril/2015

APOIO FINANCEIRO:

FAPESP

#2013/00554-6 (Bolsa no País)

#2013/14149-6 (BEPE)

#2013/21491-2 (Auxílio Regular)

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO:	1
SUMÁRIO	I
1 RESUMO.....	1
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	3
2.1 SINALIZAÇÃO DA INSULINA	4
2.2 SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	6
2.3 SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO FÍGADO	7
2.4 PAPEL DA RHO-KINASE (ROCK) EM MEDIAR A SINALIZAÇÃO DA INSULINA 9	
2.5 EXERCÍCIO FÍSICO E SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO HEPÁTICO.....	11
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARA A ETAPA 1	14
a. <i>Durante 12 semanas, avaliar o comportamento do ganho de peso corporal e glicemia de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no fígado e submetidos a uma dieta hiperlipídica;</i>	<i>15</i>
3.2.1 <i>Após 12 semanas submetidos a dieta hiperlipídica, avaliar a sensibilidade à insulina de animais.....</i>	<i>15</i>
a. <i>Durante 21 semanas avaliar o comportamento do ganho de peso de camundongos nocautes da Rock 1 no fígado e submetidos a uma dieta hiperlipídica;</i>	<i>15</i>
3.2.2 <i>Após 21 semanas submetidos a uma dieta hiperlipídica, avaliar a sensibilidade à insulina e acúmulo de gordura hepática de camundongos nocautes da Rock 1 no fígado.....</i>	<i>15</i>
a. <i>A fosforilação de proteínas essenciais na captação de glicose no tecido muscular de animais saudáveis submetidos a uma dieta controle;</i>	<i>15</i>

3.2.3 Durante 9 semanas, avaliar o comportamento do ganho de peso e glicemia de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no músculo e submetidos a uma dieta hiperlipídica;15

3.2.4 Após 9 semanas submetidos a uma dieta hiperlipídica, avaliar a fosforilação de proteínas essenciais na captação de glicose de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no músculo.15

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARA A ETAPA 215

Esta etapa consistiu em investigar o metabolismo da Rock após o exercício físico aeróbio em camundongos obesos para elucidar se as alterações positivas decorrentes do exercício físico na sinalização da insulina são decorrentes ou não da atuação da proteína Rock. Para isso esta etapa teve como objetivo:15

a. Avaliar o metabolismo da via de sinalização da insulina, através da fosforilação de proteínas essenciais na transdução do sinal da insulina após o exercício físico;.....16

3.3.1 Avaliar a formação de nova glicose a partir da administração de piruvato após o exercício físico;16

b. Avaliar o metabolismo da Rock 1 e 2 através de suas expressões e da expressão de suas moléculas: ativadora (RhoA) e inibidora (RhoE) após o exercício físico. 16

a. Avaliar a intensidade do exercício físico que induz o maior aumento nos níveis proteicos de Rock (60% e 80% da potência máxima) e por quanto tempo perdura este efeito após o exercício (16, 24 e 32h após).16

3.3.2 Avaliar o metabolismo da via de sinalização da insulina, através da fosforilação de proteínas essenciais no controle da gliconeogênese e formação de glicogênio após o exercício físico;16

3.3.3 Avaliar o metabolismo da Rock 1 e 2 através de suas expressões e da expressão de suas moléculas: ativadora (RhoA) e inibidora (RhoE) após o exercício físico; 16

3.3.4 Avaliar a associação da RhoA com Rock 2;.....16

3.3.5	Avaliar a associação da RhoE com Rock 2;.....	16
3.3.6	Avaliar a associação da Rock 2 com IRS-1;	16
3.3.7	Avaliar a fosforilação do IRS-1 no resíduo serina 632/635.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1	ETAPA 1: ANÁLISE DO METABOLISMO DA ROCK NO TECIDO HEPÁTICO E MUSCULAR	16
4.2	GERAÇÃO DOS ANIMAIS QUE APRESENTAM A ROCK 1 CONSTITUTIVAMENTE ATIVA	17
4.3	ANIMAIS NOCAUTES DA ROCK 1 NO FÍGADO	20
4.4	ETAPA 2: ANALISAR O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DA ROCK NO TECIDO HEPÁTICO E MUSCULAR	21
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS	21
4.6	ETAPA EXPERIMENTAL 1	21
4.7	ETAPA EXPERIMENTAL 2.....	22
4.8	DEMAIS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	22
4.9	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI).....	23
4.10	TESTE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)E CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO E23	
4.11	QUANTIFICAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO, GLICOSE E INSULINA SÉRICAS DE JEJUM	23
4.12	INCORPORAÇÃO DE GLICOSE MARCADA NO MÚSCULO	24
4.13	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	24
4.14	EXTRAÇÃO DOS TECIDOS, HOMOGENEIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS	25
4.15	IMUNOPRECIPITAÇÃO	25
4.16	IMUNOBLOT	26

4.17	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ROCK 1	26
4.18	ANTICORPOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO	27
4.19	HISTOLOGIA	27
4.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	27
5.1	CONTROLE DE SEGURANÇA PARA ANÁLISES DE WESTERN BLOTTING E IMUNOPRECIPITAÇÃO	28
5.2	AVALIAÇÃO GENÉTICA DA SUPERATIVIDADE E NOUCAUTE DA ROCK 129	
5.3	RESULTADOS REFERENTES A SUPERATIVAÇÃO DA ROCK 1 NO FÍGADO .30	
5.4	RESULTADOS REFERENTES A DELEÇÃO DA ROCK 1 NO FÍGADO	34
5.5	RESULTADOS REFERENTES A SUPERATIVAÇÃO DA ROCK 1 NO MÚSCULO EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA CONTROLE E HIPERLIPÍDICA	36
5.6	RESULTADOS REFERENTES ÀS RESPOSTAS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO PESO CORPORAL, SENSIBILIDADE À INSULINA E TOLERÂNCIA À GLICOSE	42
5.7	METABOLISMO DA GLICOSE E DA ROCK NO FÍGADO DE ANIMAIS OBESOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO	45
5.8	METABOLISMO DA GLICOSE E DA ROCK NO MÚSCULO DE ANIMAIS OBESOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO	47
6	DISCUSSÃO	51
6.1	SUPERATIVIDADE DA ROCK 1 NO FÍGADO	51
6.2	DELEÇÃO DA ROCK 1 NO FÍGADO	52
6.3	SUPERATIVAÇÃO DA ROCK 1 NO TECIDO MUSCULAR	52
6.4	SUPERATIVAÇÃO DA ROCK 1 NO TECIDO MUSCULAR DE ANIMAIS OBESOS53	
6.5	METABOLISMO DA ROCK NO TECIDO HEPÁTICO DE ANIMAIS OBESOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO	53

6.6	METABOLISMO DA ROCK NO TECIDO MUSCULAR DE ANIMAIS OBESOS	
	SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO	55
7	CONCLUSÃO.....	56
8	REFERÊNCIAS	57
9	PRODUÇÃO ACADÊMICA (2013-2015).....	63
	a. <i>Artigos científicos públicos em co-autoria: 12 Artigos</i>	63
	9.1.1 <i>Artigos científicos publicados como primeiro autor: 3 artigos</i>	
	<i>internacionais, sendo 2 artigos A2.</i>	63
	9.1.2 <i>Resumos publicados em anais de congresso: 22 Resumos publicados</i>	
	<i>em periódicos nacionais e internacionais</i>	63

1 RESUMO

A obesidade é uma doença que vem crescendo de forma alarmante e está associada com resistência à insulina (RI) e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, alguns tipos de câncer e o diabetes *mellitus* do tipo 2. A RI pode ser instalada tanto a nível muscular bem como hepático, colaborando fortemente para alteração inicialmente na glicemia pós-prandial e mais tardiamente na glicemia de jejum. Por outro lado, a prática regular de exercício físico é capaz de melhorar a ação da insulina tanto no músculo esquelético aumentando a captação de glicose, quanto no fígado reduzindo a formação de nova glicose (gliconeogênese). Entretanto, os efeitos do exercício físico sobre a via molecular da insulina não são totalmente conhecidos. Recentemente uma nova proteína foi classificada como mediadora da sinalização da insulina por potencializar seus efeitos, essa proteína é a Rho-kinase (Rock) que atua em tecidos periféricos (músculo esquelético, fígado e adiposo) e também, no hipotálamo, contribuindo com até 50% da ação insulina no meio intracelular. Ao contrário, animais experimentais que tiveram a deleção ou inibição da Rock se tornaram resistentes à insulina. Visto isso, estudos sobre esta molécula fazem-se necessários para melhor entendimento dessa complexa sinalização. Como ainda nenhum estudo havia sido realizado objetivando avaliar se os efeitos benéficos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina é em decorrência ou não da participação da proteína Rock, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel do exercício físico aeróbico na regulação da proteína Rock e os efeitos sobre a sinalização da insulina em músculo esquelético e fígado de camundongos obesos. Para este desfecho, este estudo foi dividido em duas etapas, sendo a primeira etapa desenvolvida na escola de medicina de Harvard e a segunda no Brasil: Etapa 1- na Escola de Medicina de Harvard, foi investigado o papel da Rock no metabolismo glicêmico hepático e muscular. Para isso, lançamos mão de animais geneticamente modificados que apresentam a superatividade ou deleção da Rock 1 no tecido hepático e também avaliamos o papel da superatividade da Rock 1 no músculo e Etapa 2- após avaliar os efeitos da deleção ou superatividade da Rock no fígado e músculo esquelético, no Brasil foi investigado o papel do exercício físico sobre o metabolismo da Rock tanto no fígado como no músculo esquelético. Resultados: Etapa 1, no fígado, foi visto que a superatividade da Rock induz maior ganho de peso corporal, resistência à insulina, hiperglicemia e acúmulo de gordura no tecido hepático e quando a Rock é deletada do tecido hepático este comportamento é revertido, assim os animais apresentaram menor ganho de

peso corporal, menor hiperglicemia e menor resistência à insulina. Etapa 2, no que se refere ao comportamento da Rock frente ao exercício físico, no tecido hepático, foi visto que o exercício físico parece reduzir sua atividade por aumentar a expressão de sua proteína inibidora (RhoE) e reduzir a expressão de sua proteína ativadora (RhoA). Em relação ao metabolismo da Rock no músculo esquelético em resposta ao exercício físico, foi possível observar que o exercício aumenta sua atividade através do aumento da expressão de RhoA e de sua associação com a Rock 2 e redução na expressão de RhoE e de sua associação com a Rock 2. Fatores estes que culminaram em uma maior fosforilação do IRS-1^{ser632/635} e assim podem ter contribuído para uma maior resposta das proteínas distais da via de sinalização da insulina como Akt e GSK3 em camundongos obesos exercitados quando comparados aos obesos controles. Portanto, a partir destes achados sugerimos que a Rock em nível hepático é nociva ao organismo por colaborar com maior ganho de peso, resistência à insulina e acúmulo de gordura hepática. Já em nível muscular a Rock contribui para a sinalização à insulina e que o exercício físico através da modulação de proteínas ativadoras e inibidoras do Rock (RhoA e RhoE respectivamente) pode aumentar atividade da Rock e a fosforilação em do IRS-1 em serina 632/635 e consequentemente maior atividade da via de sinalização da insulina em animais obesos. Ademais, neste trabalho foi observado que o exercício físico parece reduzir a atividade da Rock no tecido hepático por aumentar concentrações da molécula inibidora do Rock, a RhoE. No tecido muscular, o exercício físico controla a captação de glicose através do aumento da expressão da Rock e de sua molécula ativadora e redução de sua molécula inibidora, culminando em maior atividade dos IRS-1 em tirosina 612 e em serina 632/635. Assim, este trabalho propõe um novo mecanismo pelo qual o exercício físico pode contribuir na sinalização da insulina, evidenciando o importante papel do exercício físico no metabolismo da Rock no fígado e de forma mais expressiva no tecido muscular esquelético, colaborando, portanto, para ampliação dos estudos acerca dessa complexa via de sinalização a fim de elucidar novas terapêuticas no combate a obesidade e resistência à insulina.

Palavras-chaves: Obesidade, Resistência à insulina, Exercício Físico e Rho-quinase (Rock)

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

O Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM tipo 2) é a forma de diabetes mais prevalente na população, e por essa razão, atenções são dirigidas para a sua compreensão. Reconhecidamente, o DM tipo 2 apresenta íntima relação com a obesidade. Em 1921, Joslin mostrou que o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 era maior em indivíduos obesos do que em indivíduos magros [1]. Esta evidência foi comprovada em estudos subsequentes no qual o índice de massa corporal (IMC) mais elevado estava mais atrelado ao desenvolvimento de diabetes do tipo 2 [2, 3].

A obesidade é responsável por cerca de 18% das mortes de pessoas entre 40-85 anos de idade [4]. Do ponto de vista clínico a obesidade é definida como um estado de elevado peso corporal, mais especificamente de tecido adiposo, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde, dentre elas o DM tipo 2. A grande maioria dos indivíduos com DM tipo 2 apresenta excesso de gordura corporal. Em 2013, 8,3% da população mundial (382 milhões de pessoas) foram diagnosticadas como diabéticas. A previsão para o futuro próximo é de aumento, e a incidência de DM tipo 2 deve chegar a 420 milhões até 2025 [5]. Nos anos de 2012 e 2013 1.5-5.1 milhões de pessoas foram a óbito em decorrência desta doença, colocando-a como a 8ª causa de morte no mundo e é esperado que em até 2035 592 milhões de pessoas tenham falecido em decorrência do diabetes [6].

Em relação ao Brasil, perspectivas projetam para 2025 uma posição entre os 10 países no mundo com maior número de casos de diabetes. A doença é crescente também na população jovem, acompanhando o aumento da epidemia de obesidade entre crianças e adolescentes no país.

Com a evidência de que a obesidade e o DM tipo 2 são importantes fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares e alguns tipos de câncer, compreender as causas e os fatores determinantes de seu incremento epidêmico torna-se imprescindível na busca de soluções para retardar ou reverter a progressão desta alarmante realidade epidemiológica. Nesse sentido, diversos estudos têm sido realizados buscando identificar novas moléculas com ações regulatórias sobre a via de sinalização da insulina e consequentemente na homeostase da glicose [7–10].

Recentemente, uma proteína foi classificada como importante mediadora da sinalização da insulina por potencializar seus efeitos, à essa molécula foi dado o nome de

Rho-kinase (Rock), que possui ação em vários tecidos periféricos (músculo esquelético, fígado e adipócitos) [11] e também no sistema nervoso central (hipotálamo) [12], contribuindo com a sinalização da insulina no meio intracelular. Tal relevância do papel desta proteína na ação da insulina e homeostase da glicose foi demonstrada em um estudo que mostrou que a inibição da Rock induziu a perda da sensibilidade à insulina em roedores em até 50% [11], sugerindo esta proteína, portanto, como fator determinante na sinalização da insulina.

Visto isso, estudos acerca dessa nova proteína fazem-se necessários para melhor o entendimento dessa complexa sinalização. Sabe-se que o exercício físico atua como uma importante ferramenta na prevenção e tratamento do diabetes mellitus decorrente da obesidade por colaborar na restauração da sinalização da insulina nos tecidos periféricos, aumentando a captação de glicose pelo músculo esquelético e reduzindo a gliconeogênese pelo fígado [13, 14]. Portanto, como ainda nenhum estudo havia sido realizado objetivando avaliar se os efeitos benéficos decorrentes do exercício físico na homeostase glicêmica eram relacionados ou não com a participação da proteína Rock na via de sinalização da insulina, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos do exercício físico aeróbico no mecanismo de atuação da proteína Rock no músculo esquelético e no fígado de camundongos obesos.

2.1 Sinalização da Insulina

A insulina é um hormônio anabólico com efeitos metabólicos múltiplos [15]. Para que haja compreensão sobre como ocorrem os fenômenos desempenhados pela ação deste hormônio, é importante o pleno entendimento dos eventos que ocorrem imediatamente após o início da sinalização mediada pela insulina.

O receptor de insulina (IR) pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca, ou seja, após a conexão da insulina com seu receptor, este sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina [15, 16]. De forma geral, sua ação culmina com a ativação da função quinase do receptor, o qual propaga este sinal, fosforilando seus substratos intracelulares. Estas interações proteína-proteína são fundamentais para a propagação do sinal do receptor em direção ao efeito celular final, tais como translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUTs) do

meio intracelular para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e de proteínas e transcrição de genes específicos [15].

O IR é composto por duas subunidades α e duas subunidades β , ligadas por pontes dissulfeto (S-S), exercendo atividade como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A subunidade α é totalmente extracelular e é a porção que contém o sítio de ligação da insulina [15, 16]. A subunidade β é responsável pela transmissão do sinal, sendo uma proteína de localização transmembrânica. Uma propriedade importante da subunidade β do receptor de insulina deve-se ao fato de esta ser uma proteína com atividade quinase, estimulada pela insulina, e capaz de fosforilar a si própria e também outros substratos em aminoácidos tirosina.

Os alvos para essa atividade quinase são tanto os próprios receptores (como o IR, *insulin receptor*) como as moléculas citoplasmáticas, os quais alteram sua forma e, então, agem para mudar as atividades da célula. Em geral, o aminoácido tido como alvo pelos receptores proteínas quinase de células animais é a tirosina (porém não exclusivamente). No caso do hormônio insulina, a fosforilação dos múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163) da subunidade β do receptor aumenta ainda mais sua atividade quinase [15, 16]. Por conseguinte, como resposta à propagação desse sinal, proteínas citoplasmáticas subsequentes a esse receptor tornam-se seu alvo, apropriadamente chamados de substratos de resposta à insulina. Essas proteínas, consecutivamente, iniciam muitas respostas celulares (denominadas de cascata de sinalização da insulina), nas quais proteínas interagem com outras proteínas até as respostas finais serem alcançadas [16].

Uma vez ativado, o IR fosforila vários substratos proteicos em tirosina. Quatro destes pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (IRS-1/2/3/4). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), dentre as quais se destaca a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-q) [15, 16]. Com base em análise sequencial, existem 22 tirosinas potenciais para a fosforilação do IRS-1. Nove destas possuem uma de suas sequências repetitivas: YMXM ou YXXM, em que Y é tirosina, M é metionina e X é qualquer outro aminoácido. Seguindo-se à estimulação da insulina, estas tirosinas, como outras tirosinas potenciais na molécula de IRS-1, são rapidamente fosforiladas, resultando em uma ligação do IRS-1 com proteínas específicas.

O IRS-1 e o IRS-2 são considerados os principais substratos, e são os mais bem estudados até o momento. Sabe-se hoje que o IRS-1 e o IRS-2 fosforilados se associam à enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-q), ativando-a. A ativação da proteína PI3-q desencadeia a ativação de outras proteínas importantes, como a proteína quinase B, também conhecida como Akt. A ativação da via PI3-q/Akt está relacionada à promoção dos efeitos metabólicos da insulina (captação de glicose, glicogênese e inibição da gliconeogênese) [15]. Dentre os tecidos alvos da insulina destaca-se o músculo esquelético e o tecido hepático, no qual, a insulina participa do controle da captação de glicose e síntese de glicogênio e gliconeogênese, esta última com efeito inibitório, nos hepatócitos.

2.2 Sinalização da Insulina no Músculo Esquelético

Anormalidades na ação da insulina em estimular a captação de glicose no músculo esquelético, de inibir a produção hepática de glicose e a lipólise no tecido adiposo em geral estão presentes em indivíduos com resistência à insulina e antecedem o desenvolvimento do DM tipo 2. O músculo esquelético tem fundamental importância na homeostase glicêmica do organismo [17]. Por isso, qualquer redução na capacidade da insulina em estimular a captação de glicose neste tecido é relevante no controle da glicemia corporal total.

Entretanto, experimentos com camundongos transgênicos puderam melhor elucidar o papel da insulina sobre a captação de glicose no músculo esquelético, provendo informações que vias alternativas poderiam compensar a inexistência da ação desse hormônio. Por exemplo, a inativação do receptor de insulina (IR) no músculo esquelético, deu origem a um modelo animal de síndrome metabólica, com aumento dos depósitos de gordura no corpo e triacilgliceróis sanguíneos [18]. Estes animais denominados de MIRKO (*muscle-specific insulin receptor knockout*) não desenvolveram hiperinsulinemia e diabetes, indicando que poderia haver rotas alternativas de captação de glicose no músculo ou um desvio apropriado desta hexose para o tecido muscular. Por outro lado, a deleção do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4 – *glucose transporter type 4*) no músculo esquelético é capaz de desenvolver diabetes severo [19].

Descobertas seguintes mostraram que na ausência do receptor de insulina duas diferentes rotas têm efeito potencial na captação de glicose, sendo uma estimulada pela

contração muscular com ativação da AMPK e outra pela sinalização do fator de crescimento semelhante á insulina tipo 1 (IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*), que podem compensar a ausência do receptor de insulina [20–22]. Em resposta a contração do músculo esquelético ocorre a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), intacta nos animais MIRKO, estimulando a translocação do GLUT4 para a membrana da célula [20].

Já a importância da participação do IGF-1 na entrada de glicose no músculo foi comprovada por experimentos com deleção combinada do receptor de insulina e do IGF, no qual os camundongos desenvolveram diabetes [22]. Essas informações decorrentes de estudos experimentais permitem compreender que no músculo esquelético há caminhos alternativos para translocação do GLUT4 e consequente captação de glicose, que podem compensar a ausência do receptor de insulina. No entanto, a captação de glicose em músculo esquelético de pacientes diabéticos se mostra reduzida em comparação com os controles saudáveis. Tal fato indica que o prejuízo na deposição de glicose no músculo contribui com o baixo controle da glicemia nos pacientes com diabetes.

Adicionalmente, pacientes obesos e diabéticos apresentam menor ação da insulina no músculo com alterações sendo observadas na cascata de sinalização da insulina. Esses indivíduos apresentam menor fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e na atividade da PI3-q no músculo esquelético [23, 24]. Isso explica em parte o prejuízo na entrada de glicose estimulada por insulina no tecido muscular.

Estas alterações na via de sinalização da insulina estão relacionadas a condições metabólicas como aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes e da deposição de gordura intracelular com indução de inflamação nos tecidos periféricos (ex. músculo esquelético) de indivíduos diabéticos do tipo 2. Tem sido demonstrado em humanos e animais que o excesso de gordura corporal está associado com inflamação de baixo grau, e citocinas produzidas pelos adipócitos e infiltrado de macrófagos alteram a capacidade de transdução do sinal da insulina, diminuindo a captação de glicose [25, 26]. Além disso, ao menos em modelos animais de obesidade induzido por dieta rica em gordura se observa uma diminuição na expressão proteica da AMPK e de IGF1, sugerindo que rotas alternativas para a captação de glicose também podem ser comprometidas pela obesidade [27–29].

2.3 Sinalização da Insulina no Fígado

O papel da insulina em regular diretamente a produção hepática de glicose tem sido intensamente investigada. Entretanto, ainda não é bem elucidado como isso acontece, sendo aventado que a insulina tem papel supressivo na síntese de nova glicose através do seu efeito em tecidos periféricos como o músculo esquelético e o tecido adiposo [30, 31]. O efeito da insulina em inibir a proteólise no músculo e a lipólise no tecido adiposo reduz a oferta de aminoácidos e AGLs para o fígado, diminuindo, portanto, a gliconeogênese. Acredita-se então, que o menor fluxo de precursores gliconeogênicos decorrente da ação da insulina em tecidos periféricos, especialmente sobre o tecido adiposo, suprime a produção de glicose pelo fígado.

As manifestações metabólicas decorrentes da ação da insulina no tecido hepático também foram melhores elucidadas através do uso de animais geneticamente modificados. A ablação do receptor de insulina especificamente no tecido adiposo e no músculo esquelético, com sinalização normal no fígado, deu claras evidências do efeito direto da insulina sobre os hepatócitos [32]. Esses camundongos mantêm sensibilidade normal à insulina hepática e não desenvolvem diabetes, contudo, apresentam comprometimento na tolerância à glicose, indicando que o prejuízo na ação da insulina no fígado é um componente importante para o desenvolvimento do diabetes.

A criação do modelo geneticamente modificado de camundongos nocautes do receptor de insulina no fígado, denominado de camundongos LIRKO (*liver-specific insulin receptor knockout*) efetivamente mostrou que a ausência do receptor causa severa resistência à insulina, intolerância à glicose e incapacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose [33, 34]. Ensaios experimentais adicionais realizados nas últimas décadas têm demonstrado que a presença da insulina é fundamental para a expressão gênica de enzimas envolvidas com a gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) [8]. Prejuízos na propagação do sinal da insulina no fígado na obesidade são capazes de aumentar a produção hepática de glicose e subsequentemente causar alteração de início na glicemia pós-prandial e tardiamente na glicemia de jejum. Portanto, moléculas capazes de regular positivamente a ação da insulina podem, por conseguinte, melhorar a homeostase da glicose. Nesse sentido, a proteína recém-descoberta Rock é capaz de mediar a sinalização da insulina, com ação em diferentes tecidos, incluindo o fígado e o músculo esquelético.

2.4 *Papel da Rho-Kinase (Rock) em mediar a Sinalização da Insulina*

Rho-Kinase (Rock) é uma serina/treonina quinase identificada como uma proteína de ligação ao GTP [35] e possui duas isoformas Rock1 ou alfa [36] e Rock2 ou beta [37]. Esta proteína pode ser ativada pela ligação do complexo RhoA/GTP em seu domínio para ligação da Rho (Rho *binding domain* – RBD) ou pode ser inativa pela ligação do complexo RhoE/GTP neste mesmo domínio [35–38]. As moléculas ativadoras e inibidoras da Rock (RhoA e RhoE, respectivamente) têm suas atividades controladas pela proteína envolvida na ativação de pequenas GTPases, a GEF e pela proteína envolvida na desativação de pequenas GTPases, a GAP [39]. A Rock está envolvida em várias funções celulares tais como: organização da actina, adesão celular, motilidade celular e vascular e na contração do músculo liso. Os primeiros estudos realizados envolvendo proteínas da família Rho foram realizados em 1994, por Chong e colaboradores [40], Takai e colaboradores [41] e Ridley [42] em que os autores propuseram que proteínas da família Rho poderiam desempenhar a importante função de transmitir sinais intracelulares em diferentes tecidos.

Em 1997 Farah e colaboradores [43] sugeriram que o IRS-1 possui domínios com atração pela proteína Rock. Posteriormente, Begum e colaboradores [44] mostraram que após a Rock ser ativada pela enzima RhoA, ocorre a associação da Rock com o IRS-1 e então ocorria a fosforilação no resíduo serina dessa molécula em tecido muscular liso. Adiante, em 2005 Furukawa e colaboradores [11] sugeriram que a fosforilação em serina proposta por Begum acontecia nos resíduos serina 632/635 e que após ocorrer este fenômeno acontecia o aumento da fosforilação da Akt. Assim, Furukawa e colaboradores propuseram o mecanismo pelo qual a Rock poderia controlar a homeostase glicêmica através da fosforilação da Akt tanto em células musculares bem como em adipócitos (9). Neste estudo, os autores propõem o mecanismo de atuação da Rock em aumentar a fosforilação da Akt por fosforilar diretamente os substratos do receptor de insulina 1 (IRS-1) em serina nos resíduos 632/635 (Figura 1). A teoria de atuação da Rock proposta pelos autores é que após ocorrer a estimulação pela insulina, a Rock é ativada pelo GTP e rapidamente fosforila o IRS-1 em seus resíduos de serina, que irá ativar a PI3-K levando assim, ao aumento da captação de glicose pelo músculo. Em adição, os autores mostraram que a inibição da Rock, por reduzir a sinalização da insulina, reduz a captação de glicose em célula muscular e em adipócito e, ainda, os autores concluem que quando inibida, a Rock pode levar ao estado de resistência à insulina no músculo esquelético [11].

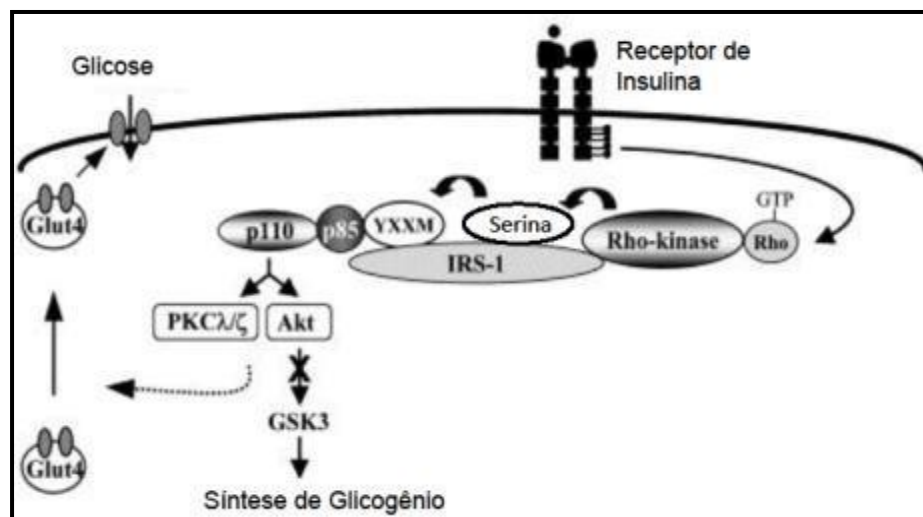


Figura 1. Mecanismo de ação pelo qual a Rock regula a sinalização e o metabolismo de glicose mediado pela insulina no músculo esquelético (Furukawa et al., 2005).

A seguir, Lee et al., em 2009 analisaram os efeitos da inibição da Rock tanto em camundongos machos bem como em fêmeas e mostraram que animais, independentemente do sexo, quando há a anulação da Rock desenvolvem a resistência à insulina por apresentarem menor fosforilação da IRS-1 em serina 632/635 e com isso menor ativação da PI3-q [45].

Em análises de tecido muscular de humanos magros, obesos não diabéticos e obesos diabéticos, Chun et al (2011) [46] mostraram que após o estímulo com insulina houve aumento da fosforilação da Rock nos indivíduos magros e obesos não diabéticos, mas não nos sujeitos obesos diabéticos [46]. Ainda em indivíduos diabéticos, Nakamura et al 2006 [47], mostraram que sujeitos hiperglicêmicos apresentaram maiores níveis de mRNA de insulina e com isso o aumento na transcrição do gene de insulina por meio da supressão da via Rho/Rho kinase, levando esses indivíduos ao estado de hiperinsulinemia (40).

Na luz destes achados, parece evidente que a proteína Rock tem efeitos importantes no controle metabólico e na sinalização da insulina, podendo estar envolvida no desenvolvimento de algumas doenças, especialmente obesidade e DM tipo 2 [48]. Como o exercício físico tem efeitos positivos sobre a sinalização da insulina, sobretudo sobre o IRS-1 [49], é possível que ele atue no metabolismo da Rock tanto no fígado bem como no tecido muscular esquelético.

2.5 *Exercício Físico e Sinalização da Insulina no Músculo Esquelético e Tecido Hepático*

O exercício físico regular favorece a homeostase glicêmica em indivíduos diabéticos, sendo um importante componente para o tratamento do DM tipo 2 [50]. Em humanos e modelos animais de experimentação, o treinamento aeróbio aumenta a captação de glicose estimulada por insulina [51, 52] e reduz a secreção de insulina em resposta aos níveis glicêmicos [53], contribuindo com isso com a homeostase da glicose. Os efeitos positivos do exercício físico, tanto agudo quanto crônico, foram confirmados em experimento com uso da técnica do clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico, em que foi observado aumento na captação de glicose nos grupos exercitados comparado a seus pares inativos no mesmo período [54].

Diversos mecanismos podem aumentar a captação de glicose em resposta ao exercício físico. Incluindo o aumento no fluxo sanguíneo, aumento na ligação da insulina ao seu receptor de membrana (IR), aumento na atividade da AMPK, entre outros [51, 54–56].

Na condição de repouso, o principal evento relacionado a captação de glicose envolve a ligação da insulina ao seu receptor e subsequente autofosforilação, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. Estudos que procuraram investigar o efeito do exercício físico sobre a sinalização da insulina, demonstraram aumento na fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e aumento da atividade da PI3q no músculo após 5 dias de treinamento em roedores [57]. Tal efeito positivo foi evidenciado também por Wojtaszewski e colaboradores em 2005, que encontraram aumento na captação de glicose e na atividade da glicogênio sintase em resposta ao exercício físico em jovens saudáveis [58]. Neste estudo, não foi encontrado mudanças nas proteínas proximais da via de sinalização da insulina.

Os estudos pioneiros e mais importantes no meio científico onde é evidenciado o efeito benéfico do exercício físico sobre a via de sinalização de insulina foram desenvolvidos por Wojtaszewski e colaboradores em 1999 [20], Wojtaszewski e colaboradores em 2000 [58] e Luciano e colaboradores em 2002 [49]. Wojtaszewski e co-autores mostraram que animais exercitados após o estímulo com insulina não apresentavam diferença na fosforilação do IR em relação ao animal sedentário, mas quando analisaram a atividade da enzima PI3-q observaram que animais exercitados apresentam a atividade da PI3-q maior em relação ao seu controle sedentário e consequentemente maior fosforilação e atividade da Akt. Posteriormente, através de um protocolo de exercício aeróbio de natação para ratos magros,

Luciano e co-autores também não encontraram diferença na fosforilação em tirosina da subunidade β do receptor de insulina entre animais treinados e controles sedentários após o estímulo com insulina. No entanto, os autores mostraram aumento na fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) após estes animais serem estimulados com insulina [49]. Em estudo realizado com humanos, Wojtaszewski e co-autores avaliaram a fosforilação do IR no músculo esquelético após o exercício físico. Neste estudo, os sujeitos realizaram exercício físico em uma perna, enquanto a outra permaneceu em repouso, após o exercício foi possível observar que também não houve diferença na fosforilação do IR quando comparada a perna exercitada com a que permaneceu em repouso.

A partir de estudos prévios em nosso laboratório foi observado que animais obesos apresentam significativa diminuição da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do substrato do 1 do receptor de insulina (IRS-1), e este aspecto foi restaurado após o exercício físico. Estes resultados demonstram que o exercício físico pode promover alterações nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina, mas a mecanística explicando o motivo pelo qual não foi encontrado diferença na fosforilação do IR β , mas maior fosforilação a partir do IRS-1 não foi elucidado até o momento. Uma vez que a Rock atua fosforilando o IRS-1 em serina 632/635 e também em tirosina promovendo maior fosforilação da Akt [46, 59], acredita-se que este mecanismo poder ser de extrema importância para explicar estes achados de Luciano e colaboradores em 2002 [49].

Além disso, estudos nas últimas décadas têm demonstrado que os efeitos do exercício não acontecem apenas no músculo esquelético, tecido diretamente envolvido com a contração muscular. Os efeitos favoráveis do exercício físico na ação da insulina se estendem ao tecido hepático.

A produção hepática de glicose é um processo metabólico essencial para a manutenção da glicemia nos períodos pós-prandiais, bem como durante a realização de um exercício físico. Para que haja este controle glicêmico, o fígado se utiliza de duas vias metabólicas, como: a) degradação do glicogênio hepático (glicogenólise) e b) pela síntese de nova molécula de glicose (gliconeogênese) a partir de precursores não glicídicos, como aminoácidos (principalmente alanina), lactato, glicerol e piruvato [60–62].

A velocidade da gliconeogênese é controlada principalmente pela atividade de enzimas que atuam em reações irreversíveis da via, como a PEPCK e a G6Pase, previamente apresentadas [62]. A expressão dos genes destas enzimas é controlada por hormônios,

principalmente a insulina, o glucagon e glicocorticóides. A insulina inibe a gliconeogênese por inativar a expressão da PEPCK e da G6Pase. A excessiva produção de glicose e o descontrole desta via de transcrição são fatores que contribuem para a hiperglicemia de jejum e pós-prandial característica no DM tipo 1 e DM tipo 2 [62].

A regulação no nível transcricional dos genes da PEPCK e da G6Pase envolve um *cross-talk* entre diversos fatores de transcrição. Os promotores da expressão destes genes têm sido amplamente estudados e sabe-se que eles são induzidos por vários estímulos (glucagon via AMPc, glicocorticóides) e fatores de transcrição (HNF-4 α , Foxo1, PGC-1 α) [62].

A proteína PGC-1 α promove a ativação dos genes gliconeogênicos ao se interagir com o fator nuclear de hepatócito 4 α (HNF-4 α) e o fator transcricional Foxo1 no núcleo. Este processo está bastante aumentado nas situações de jejum, durante a realização de um exercício físico de longa duração e em condições patológicas, como no diabetes [61–63].

Por outro lado, em situações pós-prandiais, em que há aumento da liberação de insulina, a ação deste hormônio promove a ativação da via PI3-q/Akt. Depois de ativada, a Akt fosforila a Foxo1 levando sua inibição e translocação do núcleo para o citoplasma. Esta fosforilação também promove a dissociação Foxo1/PGC-1 α , que por consequência, inativa a ação promotora da PGC-1 α [61–63].

Após o exercício físico o organismo se dispõe de diversos mecanismos para o retorno da homeostase e para recuperação ao estresse sofrido, tais como: 1- a captação de glicose continua aumentada, tanto nas células musculares, como hepáticas; 2- há um aumento da atividade da enzima glicogênio sintase (GS) muscular e hepática, para que os estoques de glicogênio sejam restaurados e até mesmo, aumentados em relação ao conteúdo existentes pré-exercício (supercompensação) e 3- há um aumento da fosforilação da Foxo1, que leva à redução da atividade da PGC-1 α como agente transcritor no núcleo do hepatócito e consequentemente resultando em uma diminuição da gliconeogênese, por reduzir a transcrição das enzimas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase [14].

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que animais obesos induzidos por dieta rica em gordura apresentam diminuição na sinalização da insulina e isto foi acompanhado por aumento nos níveis proteicos de PEPCK e G6Pase e, consequentemente, pelo aumento na produção hepática de glicose [8, 64]. Ao contrário, animais obesos, quando exercitados, tiveram melhora na sinalização da insulina, aumento na fosforilação de Foxo1 e

redução das enzimas gliconeogênicas. Em adição, foi demonstrado que animais submetidos a dieta rica em gordura apresentaram maior expressão de PGC1- α e de sua associação com a Foxo1 no núcleo dos hepatócitos, sendo estas alterações revertidas com o treinamento físico. Portanto, pode-se dizer que a prática regular de exercício físico é de suma importância para a redução da produção de glicose pelo fígado [8, 64].

Portanto, fica claro o papel do exercício físico em promover alterações positivas sobre a via de sinalização da insulina tanto no tecido muscular esquelético como no hepático e assim, conseguindo reduzir a hiperglicemia de jejum em organismos obesos e diabéticos. Ainda nenhum estudo foi realizado mostrando se estas alterações positivas em resposta ao exercício físico sobre a via de sinalização da insulina no tecido muscular e hepático é em decorrência ou não da participação da proteína Rock.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo objetivou investigar o metabolismo da proteína Rock e o seu papel após a realização de exercício físico aeróbio na sinalização da insulina no tecido muscular e hepático em animais obesos.

Para isso, este estudo foi dividido em 2 etapas, onde inicialmente objetivou-se elucidar o metabolismo da Rock no tecido hepático e muscular sobre a homeostase glicêmica (Universidade de Medicina de Harvard) e em uma segunda etapa, o objetivo foi para avaliar o papel da Rock em resposta ao exercício físico no tecido muscular e hepático.

3.2 Objetivos Específicos para a Etapa 1

Esta etapa consistiu em investigar o papel da Rock no tecido hepático e muscular, para isso lançamos mão do uso de 3 tipos de animais geneticamente modificados.

- 1- Animais geneticamente modificados que apresentam superatividade da Rock 1 no Fígado, investigar:

- a. Durante 12 semanas, avaliar o comportamento do ganho de peso corporal e glicemia de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no fígado e submetidos a uma dieta hiperlipídica;
- 3.2.1 Após 12 semanas submetidos a dieta hiperlipídica, avaliar a sensibilidade à insulina de animais.
- 2- Animais geneticamente modificados que apresentam deleção da Rock 1 no fígado, investigar:
 - a. Durante 21 semanas avaliar o comportamento do ganho de peso de camundongos nocautes da Rock 1 no fígado e submetidos a uma dieta hiperlipídica;
- 3.2.2 Após 21 semanas submetidos a uma dieta hiperlipídica, avaliar a sensibilidade à insulina e acúmulo de gordura hepática de camundongos nocautes da Rock 1 no fígado.
- 3- Animais geneticamente modificados que apresentam superatividade da Rock 1 no músculo, investigar:
 - a. A fosforilação de proteínas essenciais na captação de glicose no tecido muscular de animais saudáveis submetidos a uma dieta controle;
- 3.2.3 Durante 9 semanas, avaliar o comportamento do ganho de peso e glicemia de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no músculo e submetidos a uma dieta hiperlipídica;
- 3.2.4 Após 9 semanas submetidos a uma dieta hiperlipídica, avaliar a fosforilação de proteínas essenciais na captação de glicose de camundongos que apresentam a superatividade da Rock 1 no músculo.

3.3 *Objetivos Específicos para a Etapa 2*

Esta etapa consistiu em investigar o metabolismo da Rock após o exercício físico aeróbico em camundongos obesos para elucidar se as alterações positivas decorrentes do exercício físico na sinalização da insulina são decorrentes ou não da atuação da proteína Rock. Para isso esta etapa teve como objetivo:

- 4 – No tecido hepático:

- a. Avaliar o metabolismo da via de sinalização da insulina, através da fosforilação de proteínas essenciais na transdução do sinal da insulina após o exercício físico;
- 3.3.1 Avaliar a formação de nova glicose a partir da administração de piruvato após o exercício físico;
- b. Avaliar o metabolismo da Rock 1 e 2 através de suas expressões e da expressão de suas moléculas: ativadora (RhoA) e inibidora (RhoE) após o exercício físico.
- 4- No tecido muscular:
- a. Avaliar a intensidade do exercício físico que induz o maior aumento nos níveis proteicos de Rock (60% e 80% da potência máxima) e por quanto tempo perdura este efeito após o exercício (16, 24 e 32h após).
- 3.3.2 Avaliar o metabolismo da via de sinalização da insulina, através da fosforilação de proteínas essenciais no controle da gliconeogênese e formação de glicogênio após o exercício físico;
- 3.3.3 Avaliar o metabolismo da Rock 1 e 2 através de suas expressões e da expressão de suas moléculas: ativadora (RhoA) e inibidora (RhoE) após o exercício físico;
- 3.3.4 Avaliar a associação da RhoA com Rock 2;
- 3.3.5 Avaliar a associação da RhoE com Rock 2;
- 3.3.6 Avaliar a associação da Rock 2 com IRS-1;
- 3.3.7 Avaliar a fosforilação do IRS-1 no resíduo serina 632/635.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapa 1: Análise do metabolismo da Rock no tecido hepático e muscular

Animais

Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo comitê de ética de uso e cuidados animais dos EUA (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da Faculdade de Medicina de Harvard. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso a água e ração convencional ou hiperlipídica. Em todas as etapas do estudo os animais foram pesados semanalmente e foi feito o controle da ingestão alimentar.

4.2 *Geração dos animais que apresentam a Rock 1 constitutivamente ativa*

Para a geração dos animais que apresentam a Rock 1 constitutivamente ativa (animais knockin / CA-Rock 1) no músculo e fígado, um vetor alvo carregando o mutante constitutivamente ativo de Rock 1 (human D3 CA-Rock1) foi utilizado como vetor dentro do locus ROSA 26 através de recombinação homóloga. O vetor foi introduzido no locus ROSA 26 pelo fato deste locus já ser comprovadamente o ideal para geração de animais constitutivamente ativos, assim ele é comumente usado na engenharia genética para geração de animais constitutivamente ativo [65, 66]. Um cassete de parada de transcrição da CA-Rock 1 foi adicionado, flanqueado por LoxP, antes do vetor CA-Rock 1, para manter a região promotora da Rock1 silenciada até a introdução da enzima Cre recombinase. O promotor de ubiquitina C foi usado para ativar a expressão do cDNA do CA-Rock 1 somente quando o loxP-stop-loxP é removido pela Cre recombinase. Um novo cassete conduzido por um promotor da PGK foi usado para facilitar a seleção de clones de células embrionárias positivas (Figura 1). Após a transmissão da linha germinativa, os camundongos foram cruzados com C57BL/6J cre recombinase para remover o cassete de parada (STOP) e então a CA-Rock 1 passava a ficar constitutivamente ativada (Figura 2). O papel do vetor mutante da CA-Rock1 é de retirar o domínio PH da molécula da Rock e com isso deixar exposta a região kinase da Rock1 o que leva a molécula permanecer constitutivamente ativa [65] (Figura 3).

4.3 *CA-Rock 1 no fígado*

Para geração de animais que apresentam a super atividade da Rock1 no fígado, animais carregando o vetor mutante da Rock1 no locus ROSA 26 foram cruzados com animais geneticamente modificados que carregavam o gene promotor da enzima Cre recombinase no fígado (Albumim Cre mice) (Figura 2).

4.4 *CA-Rock 1 no músculo*

Para a geração de animais que apresentam a super atividade da Rock1 no músculo, animais carregando o vetor mutante da Rock1 no locus ROSA 26 foram cruzados com

animais geneticamente modificados que carregavam o gene promotor da enzima Cre recombinase no músculo (Myogen Cre mice) (Figura 2).

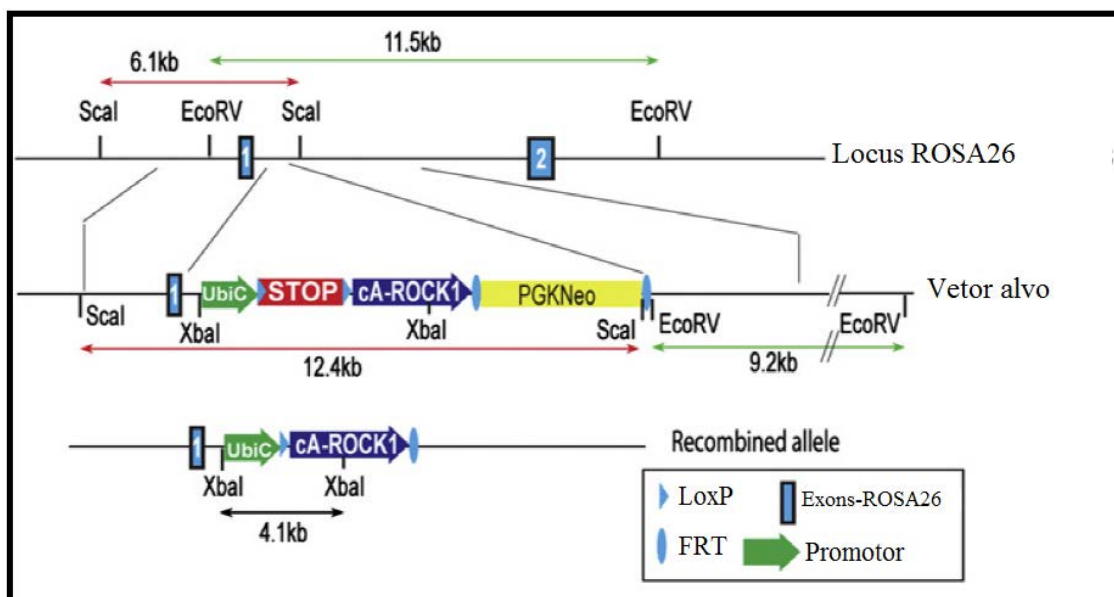


Figura 2. O diagrama esquemático ilustra o locus alvo ROSA26, construção do alvo CA-Rock1, e o alelo condicional após recombinação homóloga. Em vermelho o agente de parada flanked por *loxP* (*loxP-stop-loxP*) que não permite o contato do agente promotor *UbiC* com a *CA-Rock*. O agente promotor ubiquitina C (*UbiC*; seta verde) foi usado para elevar à expressão da *Rock1* cDNA constitutivamente ativa (*CA-Rock1*; seta azul) [65].

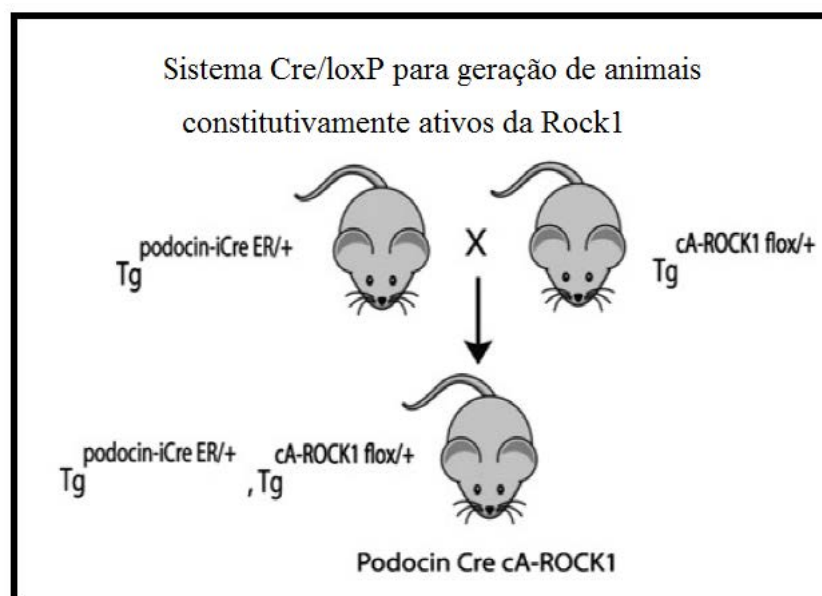


Figura 3. Esquema de cruzamento de animais geneticamente modificados que carregam o vetor mutante CA-Rock com animais que carregam a enzima Cre recombinase que atua nos flancos do cassete de parada e assim permitindo o contato da *UbiC* com *CA-Rock* promovendo a superatividade da *Rock*.

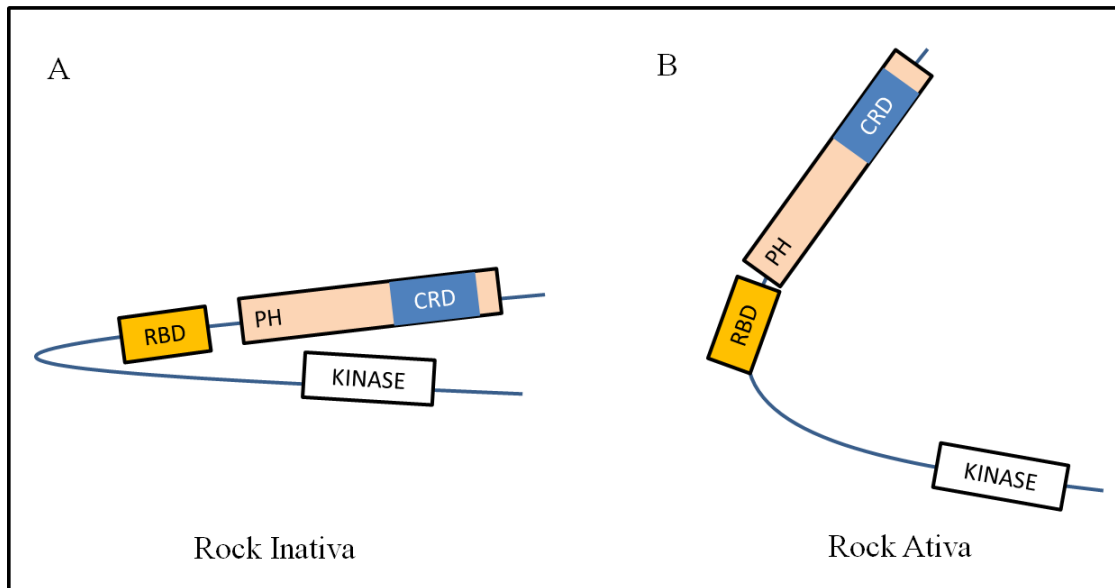


Figura 4. Ilustração da molécula Rock inativa (A) e na forma ativa (B).

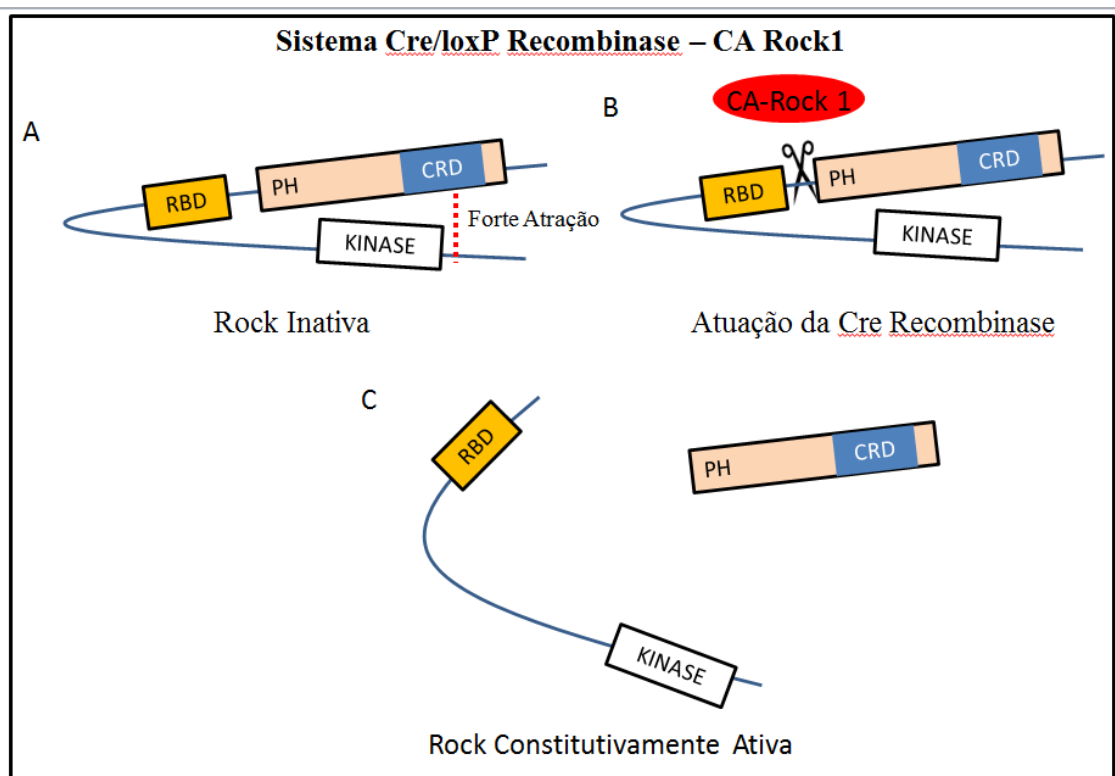


Figura 5. Esquema da geração dos animais que apresentam a Rock constitutivamente ativa através do vetor mutante CA-Rock. A Rock apresenta forte atração entre os domínios cinase e o domínio homólogo à plequistrina (PH), isso faz com que a região cinase não fique exposta e desempenhe sua função cinase (4A). A Rock, quando ativada, o domínio PH perde afinidade pelo domínio cinase, expondo a região cinase da molécula (Figura 3A). O vetor mutante da Rock (CA-Rock 1) atua sobre a molécula da Rock dividindo-a em duas partes, sendo uma parte onde está situado o domínio PH e a outra onde se encontra a região de ligação da Rho (Rho binding domain) e a região cinase (4B). Com a ausência do domínio PH, que encobre o a região cinase, a molécula Rock não fica mais inativa, permanecendo portanto como uma molécula constitutivamente ativa.

4.5 Animais nocautes da Rock 1 no fígado

Animais com deleção da Rock 1 no fígado foram gerados através do cruzamento de camundongos homozigóticos para o alelo Rock1 loxP-modificado com camundongos que carregam a enzima Cre recombinase no fígado (camundongos Albumin Cre – (Alb-Cre)). A geração Rock1^{flox/wt} desse cruzamento foi cruzada com camundongos Alb-Cre, para gerar os camundongos Rock1^{flox/flox}. Os animais controles também foram obtidos do mesmo cruzamento (Figura 5). O animal transgênico Rock 1 loxP foi gerado com sequencias de flancos de loxP no alelo 5' e 3' da Rock. A geração de animais que possuem a Rock 1 flanqueada pelos loxP, tiveram a deleção da Rock 1 na presença da enzima Cre recombinase [67]. Uma pequena alíquota da cauda dos animais foi extraída para a genotipagem de DNA através da reação de polymerase chain reaction (PCR) [68]. Para avaliar a deleção da Rock no fígado de camundongos transgênicos Alb-Cre e homozigóticos para loxP, avaliou-se a expressão da Rock no tecido hepático. Para a realização dos experimentos foi determinado que todos os animais do estudo tinham o mesmo background genético. Para isso, todos os cruzamentos do estudo foram realizados entre animais heterozigóticos para a enzima Cre recombinase e animais homozigóticos para loxP 1. Assim, após o cruzamento, a genotipagem foi realizada e 100% dos animais apresentavam loxP flanqueando o gene da Rock. Os animais que não apresentavam a Cre recombinase foram utilizados como controle e os animais que apresentavam a Cre recombinase utilizados como animais nocautes.

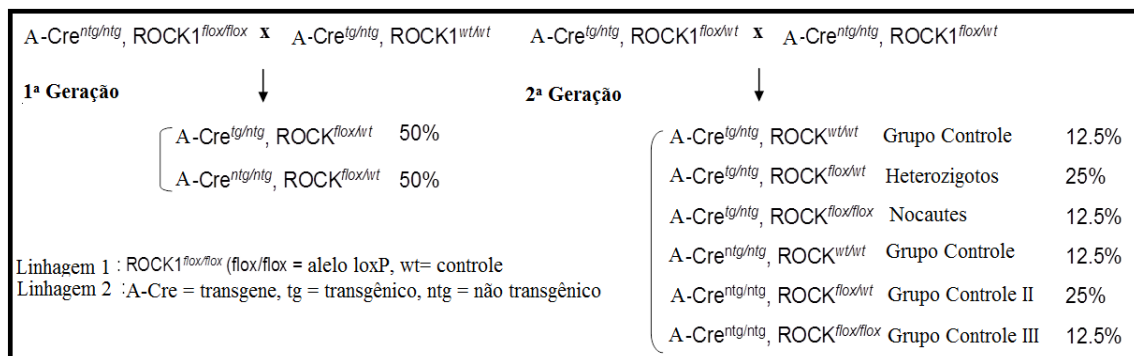


Figura 6. Esquema representativo da geração de animais nocautes da Rock 1 no fígado a partir do cruzamento de animais homozigóticos para loxP flanqueando a Rock 1 e animais Alb-Cre.

4.6 *Etapa 2: Analisar o papel do exercício físico no metabolismo da Rock no tecido hepático e muscular*

4.7 *Caracterização dos animais*

Foram utilizados camundongos Swiss com 4 semanas de vida e massa corporal de 15 a 20g, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIBE). Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). Antes do início da prática experimental todos os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Biociências, da UNESP – Campus de Rio Claro.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso a água e ração convencional ou hiperlipídica. Em todas as etapas os animais foram pesados semanalmente e foi feito o controle da ingestão alimentar.

4.8 *Etapa experimental 1*

A primeira etapa foi composta por teste incremental e protocolo de exercício físico agudo com uso de animais controles (magros). Os animais foram adaptados ao exercício em esteira rolante durante 5 dias, 10min/dia na velocidade de 3m/min. Conforme padronizado por Ferreira e colaboradores em 2007 [69], o teste de carga incremental foi iniciado na velocidade de 6m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3m/min a cada 3min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorrerá quando os mesmos encostarem 5 vezes no final da esteira no intervalo de 1min.

A potência máxima ($P_{m\acute{a}x}$) foi definida como a velocidade (m/min) de exaustão obtida por cada animal. Após a definição da $P_{m\acute{a}x}$, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Grupo 1, animais exercitados em intensidade leve (60% da $P_{m\acute{a}x}$, $n=6$): animais que foram submetidos à uma única sessão de exercício na intensidade correspondente a 60% da potência máxima; e Grupo 2, animais exercitados em intensidade moderada-alta (80% da $P_{m\acute{a}x}$, $n=6$): animais que foram submetidos à uma única sessão de exercício na intensidade correspondente a 80% da potência máxima. Além disso, será utilizado um grupo controle sedentário (Grupo 3), que não foi submetido ao exercício físico.

Além da intensidade, esta etapa visa determinar por quanto tempo perdura o efeito do exercício físico, assim o sacrifício dos animais foi realizado após 16, 24 e 36 horas após o

término da sessão de exercício. Objetivou-se, com isso, determinar a melhor intensidade e o melhor tempo após o exercício físico que foi capaz de modular os níveis proteicos da proteína Rock no músculo e fígado dos animais. Os resultados encontrados nesta etapa foram utilizados ao longo de todo o experimento com camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

4.9 Etapa experimental 2

Nesta segunda etapa, os camundongos foram divididos em 3 grupos, sendo eles: Controle (C, n=6), Obeso sedentário (O-S, n=6), e Obeso treinado (OB-T, n=6). O treinamento aeróbio foi composto por 8 semanas divididas em 2 fases: - Fase 1 (F1): foi composta por 4 semanas em que o volume foi aumentado gradativamente; - Fase 2 (F2): o volume da última semana da fase de treinamento 1 (F1) foi mantido pelas próximas 4 semanas; cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso (conforme tabela 1). O treinamento físico teve início após a indução da obesidade com a dieta hiperlipídica (8 semanas) e teve duração de 8 semanas, num total de 16 semanas de experimento. Novamente, a intensidade e o tempo de sacrifício após a sessão de esforço foram definidos na etapa 1. Os resultados obtidos nesta etapa permitiram comparar os resultados obtidos na etapa 2, permitindo observar se os efeitos do exercício físico estão relacionados a última sessão de exercício ou ao treinamento físico.

1. Tabela 1. Protocolo de treinamento

Semana de experimento	Fase do treinamento	Intensidade (%P_{max})*	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação	Intervalo entre as sessões (h)
8	F1	60	15	1	0	24
9	F1	60	30	1	0	24
10	F1	60	45	1	0	24
11	F1	60	60	1	0	24
12-16	F2	60	60	1	0	24

* P_{máx}, potência máxima. A P_{máx} será definida na etapa 1 do experimento. Etapa experimental 4

4.10 Demais procedimentos experimentais

Na etapa 1 do presente estudo foi realizado a análise da sensibilidade á insulina através do teste de tolerância á insulina (TTI) e a determinação dos níveis proteicos da proteína Rock, através da técnica de imunoblot. Nas demais etapas foram realizadas todos os procedimentos descritos a seguir.

4.11 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Com jejum prévio de 6 horas e após 24 horas da última sessão de treinamento físico, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (TTI). Para isso, os camundongos receberam injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos a partir da cauda dos animais para a determinação da glicose sérica. O tempo 0 representa o valor basal de glicose dos animais que antecedem a injeção de insulina. A taxa constante de captação da glicose plasmática (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/\text{meia-vida biológica (t}_{1/2})$. A glicose plasmática $t_{1/2}$ foi calculada a partir da inclinação da última análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear [70].

4.12 Teste Tolerância ao Piruvato (TTP)e Conteúdo de glicogênio e

O teste de tolerância ao piruvato (TTP) foi realizado para estimar a gliconeogênese, observando os seguintes passos. Os camundongos permaneceram em jejum por 16 horas, e depois receberam injeção intraperitoneal de piruvato (2g/kg) dissolvido em salina (Sigma®-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os níveis de glicose sanguínea foram coletados através da cauda dos animais a cada 30 min. durante 2h usando um glicosímetro (Advantage. Boehringer Mannheim, USA).

O glicogênio foi quantificado no músculo e fígado dos animais através da técnica proposta por Dubois e colaboradores em 1956 [71].

4.13 Quantificação do perfil lipídico, glicose e insulina séricas de jejum

Os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e suas frações foram analisados através de kits comerciais (Laborlab), os níveis de glicose foram determinados pelo método colorimétrico utilizando um glicosímetro (Advantage. Boehringer Mannheim, USA). O plasma foi separado por centrifugação (1100 G) por 15 minutos a 4°C e armazenados a - 80°C até serem analisadas. O perfil lipídico circulante será determinado através de Kits comerciais (Laborlab®). O teste de radioimunoensaio (RIA) foi utilizado para medir insulina sérica de acordo com a descrição prévia [72].

4.14 Incorporação de glicose marcada no músculo

Visando avaliar o metabolismo da glicose, fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 $\mu\text{Ci/mL}$), [^3H] 2- deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e gaseamento contínuo com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco anteriormente citado. Foi avaliada a captação de glicose utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^3H da 2-DG e do ^{14}C da glicose, respectivamente. A medida da quantidade de glicose oxidada foi feita através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma). A descrição completa dos procedimentos acha-se descrita em Nunes e Mello, 2005 [73].

4.15 Eutanásia dos animais

Os camundongos receberam previamente aos procedimentos cirúrgicos e de extração dos tecidos injeção intraperitoneal (i.p.) de *ketamine chlorohydrate* (50 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) e *xylazine* (20 mg/kg; Rompun; Bayer, Leverkusen), e eutanasiados por decapitação. Todos os animais permaneceram em jejum de 8 horas antes dos procedimentos de extração dos tecidos.

4.16 *Extração dos tecidos, homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais*

Amostras do músculo esquelético (gastrocnêmio) e do fígado foram retiradas após injeção de 1U/Kg de insulina via intraperitoneal, animais controles receberam salina. Após 10min da injeção de insulina, amostras do tecido hepático e muscular, respectivamente, foram retiradas. Posteriormente elas foram homogeneizadas em tampão de extração (1% Triton-X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato sódico, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina/mL) em 4 °C com o equipamento Tissue Lyzer Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operado na máxima velocidade por 30s. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C em um rotor Beckman 70.1 Ti (Palo Alto, CA) por 40 min para remover o material insolúvel, e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizada para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotolorimétrico de Biureto [74], enquanto que a outra parte foi submetida à imunoprecipitação (IP) e imunoblot (IB) com anticorpos específicos. O tecido adiposo epididimal, mesentérico, subcutâneo e retroperitoneal foram retirados e pesados em balança analítica para comparação entre os grupos.

4.17 *Imunoprecipitação*

Após determinação do conteúdo de proteínas totais, o sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, a 4 °C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado com proteína A ou G- Sepharose 6 MB por 12 horas à 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (11000 rpm, 20 minutos, 4 °C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada (11000rpm, 4 °C). As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (65) contendo 100 mmol/l de DTT e aquecidas em água fervente por 5-10 minutos. A seguir, quantidades iguais de proteína (5 mg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD (Mini- Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 V em períodos de tempo variáveis em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A ligação dos anticorpos às proteínas não- específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana com

tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1 hora em temperatura ambiente, como descrito previamente por De Souza e colaboradores [75]. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram incubadas *overnight* com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo, e então, lavadas por 15 minutos com solução basal. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora na temperatura ambiente com o anticorpo secundário (com peroxidase-HRP diluído em solução basal contendo leite desnatado, 1%) referente às especificações dispostas no primeiro anticorpo utilizado. As membranas foram novamente lavadas por 3 vezes de 5 minutos com solução basal e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce Reagents) por 5 minutos e expostas a filmes fotossensíveis de RX Kodak e revelados por método tradicional (máquina de Raios-X). As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado o programa Image J.

4.18 *Imunoblot*

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli [76] contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (200 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE conforme descrito anteriormente.

4.19 *Avaliação da atividade da Rock 1*

A atividade da Rock foi avaliada através da fosforilação de seu principal substrato o MYPT-1. Para isso, foi realizado um ensaio onde foi adicionado: tecido muscular (~200mg de proteína), ATP e MYPT1 (654-880) (Millipore®). Após 30min sob agitação a 30°C a reação foi neutralizada com a adição do Laemmli 4x. A seguir, as amostras foram submetidas ao protocolo convencional de western blotting. A atividade da Rock foi mensurada de acordo com a expressão do phospho-MYPT-1 [65].

4.20 Anticorpos utilizados no experimento

Os anticorpos usados para imunoblot serão: anti-IR β , antiphospho-IR β , anti-IRS-1, antiphospho-IRS-1, anti-phospho-IRS-1 (Ser632 e 635), anti-Akt, antiphospho [Ser473] Akt, anti-GSK3 β , anti-phospho-GSK3 β , anti-Foxo1, anti-phospho-Foxo1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), Anti-Rock1, anti-Rock2, anti-G6Pase, anti-PGC-1 α , anti-PI3-q e anti- α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

4.21 Histologia

Após a eutanásia dos animais que apresentam a superativação da Rock 1 no fígado ou a deleção deste gene, alíquotas hepáticas foram coletadas para análise do acúmulo de gordura. Primeiramente, os tecidos foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo na espessura de 5 μ m. Posteriormente, os cortes foram submetidos a técnica de coloração de Hematoxilina e Eosina. Para isso, os cortes foram hidratados por 1 minuto, corados com hematoxilina por 10 minutos, lavados e corados com eosina por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e secados à temperatura ambiente (adaptado de Junqueira & Junqueira [77]).

4.22 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Os resultados dos “Westerns blot ou imunoblot” foram apresentados como comparações diretas das bandas proteicas nas autorradiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa Image J. Os dados foram analisados através de teste “t de *Student*”, quando comparados dois grupos. E análise de variância (Anova), seguida do teste de múltiplas médias de Bonferroni, quando apropriado para comparar os grupos controle e experimentais. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. O programa Prisma foi empregado para efetuar as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Controle de segurança para análises de western blotting e imunoprecipitação

Com o objetivo de estabelecer um rigoroso controle nas análises de western blotting e imunoprecipitação do presente estudo, após a homogeneização das amostras, inicialmente foi realizada a quantificação das proteínas totais. Para um fidedigno resultado, as amostras em triplicatas, foram calculadas a partir de uma curva de amostras padrão (0 - 2,5mg de proteína/ml) que continha 11 pontos com intervalos de 0,25mg/ml de proteína entre cada ponto da curva. A quantificação das proteínas para as amostras só eram calculadas uma vez que o “R²” da curva padrão fosse $\geq 0,90$ (exemplo da curva padrão Figura 6).

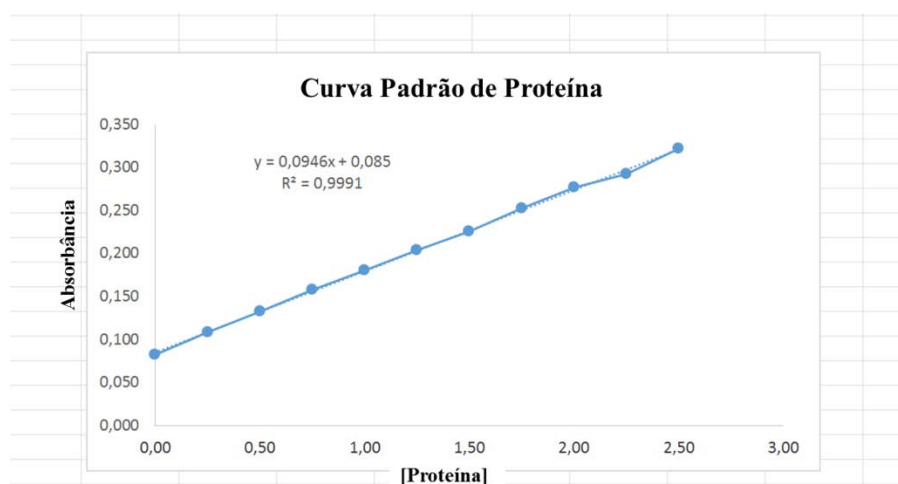


Figura 7. Representação da curva padrão de proteína para quantificação de proteína total das amostras para ensaios de western blotting e imunoprecipitação. O cálculo da proteína total das amostras somente era realizado se o “R²” fosse $\geq 0,90$.

A avaliação visual da coloração da membrana após sua imersão em solução de *ponceau*, com o objetivo de comprovar que foi utilizada a mesma quantidade de proteína para todas as amostras, foi realizada após a quantificação de proteínas totais das amostras e das corridas e transferências em gel de acrilamida e membrana de nitrocelulose respectivamente. Dava-se continuidade ao ensaio de western blotting ou imunoprecipitação somente se a imagem da membrana após coloração com solução de *ponceau* fosse homogênea entre todas as colunas, vide exemplos de membranas coradas na figura 7 (Figura 7A-F).

Após a quantificação de proteínas totais das amostras, corridas em gel de acrilamida e transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, foi realizada a avaliação visual da coloração da membrana após sua imersão em solução de *ponceau* com o objetivo de comprovar que foi utilizada a mesma quantidade de proteína para todas as amostras. Dava-se continuidade ao ensaio de western blotting ou imunoprecipitação somente se a imagem da

membrana após coloração com solução de *ponceau* fosse homogênea entre todas as colunas, vide exemplos de membranas coradas na figura 7 (Figura 7A-F).

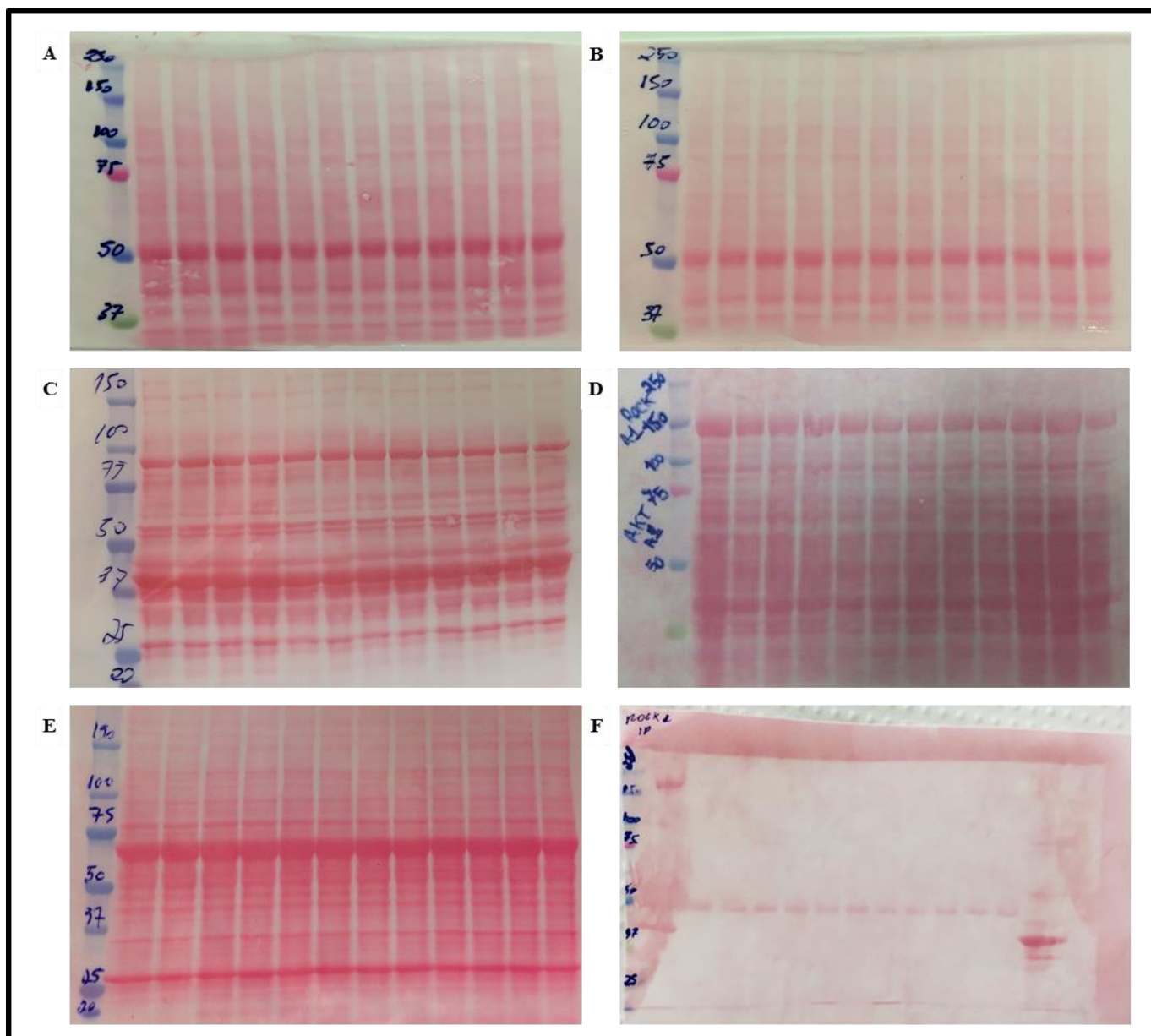


Figura 8 Exemplos de algumas membranas de nitrocelulose após a transferência de proteínas do gel de acrilamida para a membrana e após a coloração com a solução de *ponceau* obtidas durante o estudo. A homogeneidade entre as amostras foi avaliada através da similaridade da intensidade da cor vermelha entre as colunas. As membranas de A – E são resultantes do ensaio de western blotting e membrana F é derivada do ensaio de imunoprecipitação.

5.2 Avaliação genética da superatividade e noucaute da Rock 1

Para a geração de animais que possuem a Rock 1 superativada, tanto no tecido hepático ou muscular, primeiramente é necessário que estes animais expressem o flanqueamento de loxP no cassete de parada (para a superatividade da Rock 1) ou

flanqueamento de loxP no alelo 5 e 5' da Rock 1 (para os animais nocautes de Rock 1). Na figura 8A, há um exemplo de resultado encontrado nas análises genéticas para loxP, animais que não expressam a banda não possui os pares de flancos em sua cadeia genética, ao contrário animais que expressam a banda apresentam os pares de loxP para flanquear ou o cassete de parada nos CA-Rock 1 ou no alelo 5 e 5' da Rock para os animais nocautes.

A enzima Cre recombinase tem como função atuar nos flancos de loxP para retirar o cassete de parada nos animais CA – Rock1 ou no alelo 5 e 5' da Rock 1 para os animais nocautes. A análise de sua genotipagem é exemplificada na Figura 8B. Animais que apresentam somente a banda superior não expressam a Cre recombinase, já os animais que expressam as duas bandas são animais que expressam a enzima Cre recombinase (Figura 8B).

A enzima CA-Rock1 atua em retirar o domínio PH da molécula Rock 1 e com isso faz com que não ocorra a sobreposição e inativação do domínio kinase da Rock. Os animais geneticamente modificados que possuem ou não a expressão da CA-Rock 1 também foram avaliados através de genotipagem para detecção da CA – Rock 1 em sua cadeia genética. Na figura 8C é exemplificado os resultados encontrados durante o experimento, animais que apresentaram uma banda são os animais que expressam a CA-Rock1, por outro lado os animais que não apresentam a banda são os animais que não expressam a enzima CA-Rock1 (Figura 8C).

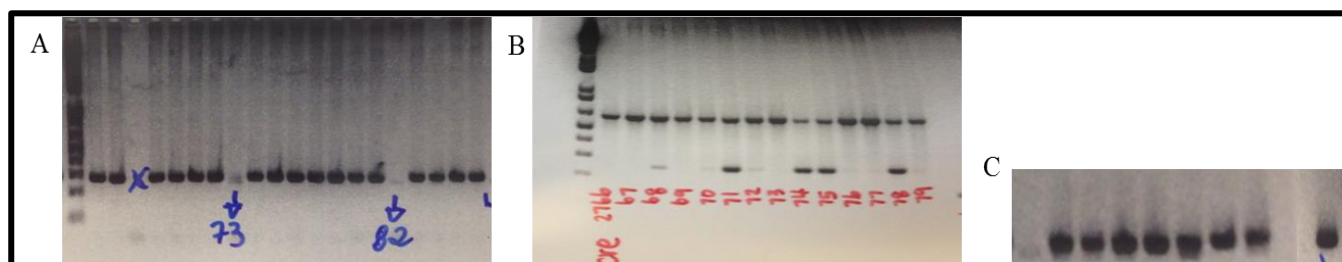


Figura 8

5.3 Resultados referentes a superativação da Rock 1 no fígado

Após 12 submetidos à uma dieta rica em gordura, foi possível observar que animais quando apresentavam a superatividade da Rock 1 no fígado ganharam mais peso corporal em relação a animais controles quando ambos foram submetidos a uma dieta rica em gordura

(Figura 9A e B). Ainda, no mesmo estudo após 12 submetidos à uma dieta rica em gordura, foi possível observar que animais quando apresentavam a superatividade da Rock 1 no fígado apresentaram maior glicemia ao longo de todo o experimento em relação a animais controles quando ambos foram submetidos a uma dieta rica em gordura (Figura 10A e B). Ao final do experimento foi possível observar que estes animais também se tornaram mais resistentes à insulina através do teste de tolerância à insulina (Figura 11), mais intolerantes à glicose e hiperinsulinêmicos (Figura 12A-C) e acumularam mais gordura no tecido hepático (Figura 13).

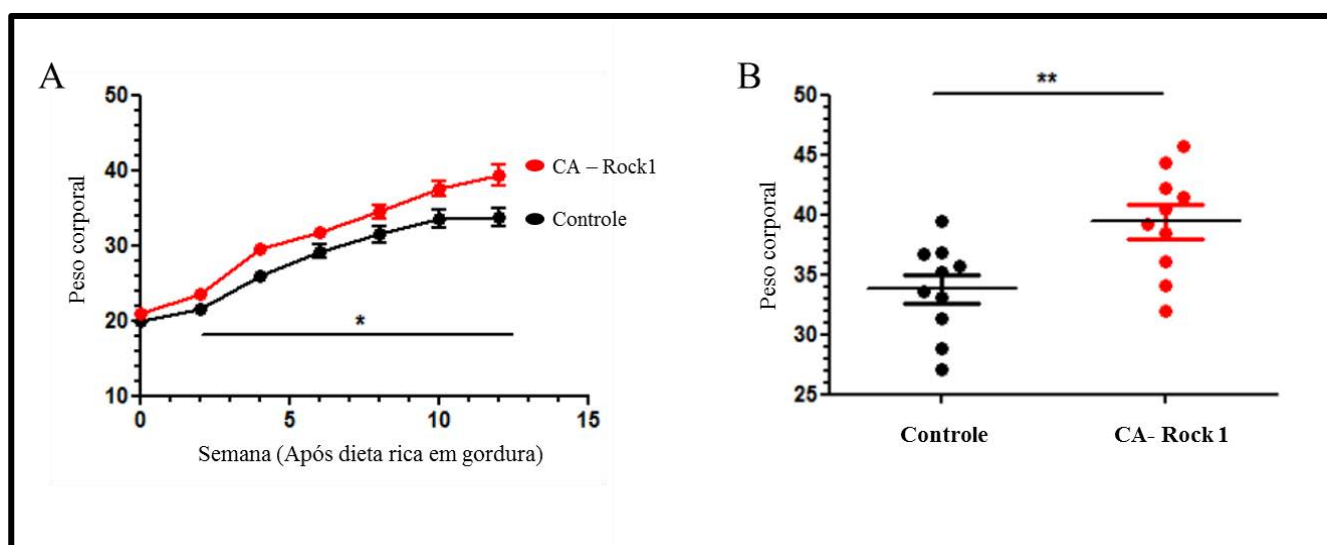


Figura 10. Peso corporal de animais com superativação da Rock 1 no fígado ao longo de todo o experimento (Figura 6A) e ao final de 12 semanas submetidos a uma dieta rica em gordura (Figura 6B). Para cada grupo foi utilizados 10 animais. O teste t-student foi utilizado para comparação entre as médias dos dois grupos e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

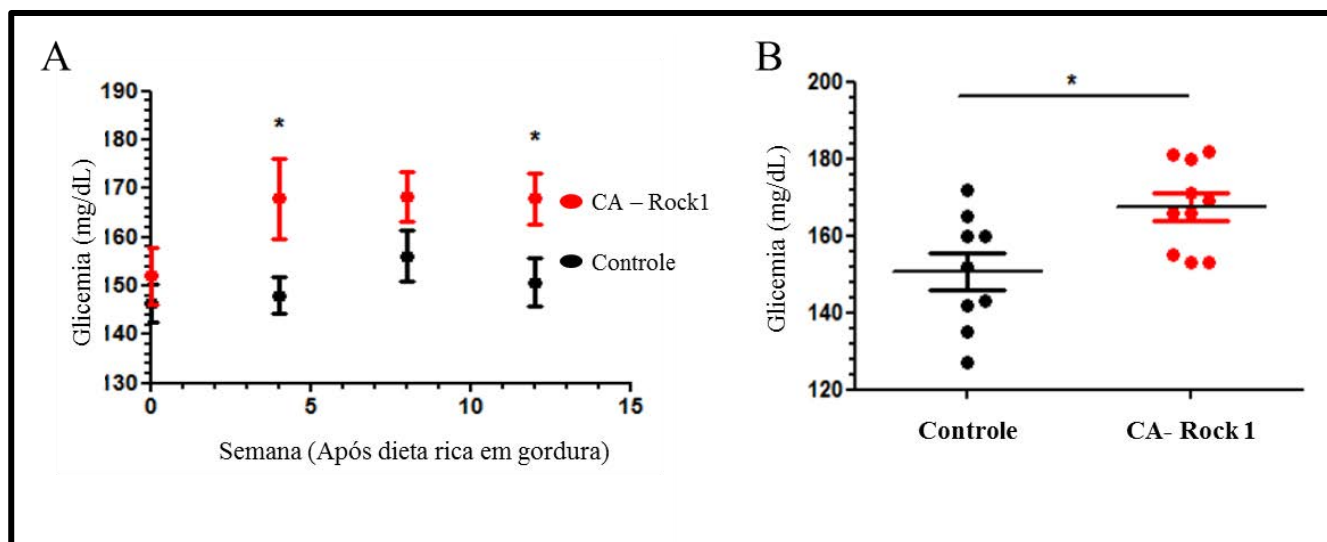


Figura 11. Glicemia de animais com superativação da Rock 1 no fígado ao longo de todo o experimento (Figura 7A) e ao final de 12 semanas submetidos a uma dieta rica em gordura (Figura 7B). Para cada grupo foi utilizados 10 animais. O teste t-student foi utilizado para comparação entre as médias dos dois grupos e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

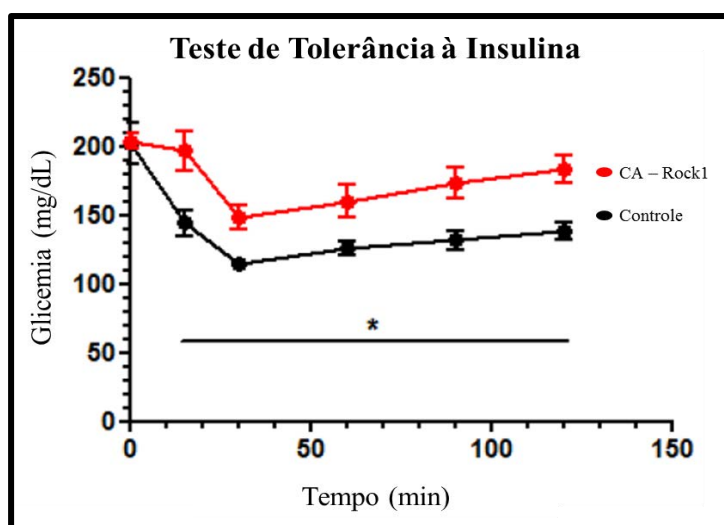


Figura 12. Teste de tolerância à insulina realizado ao final do experimento (12 semanas). Para cada grupo foi utilizados 10 animais. Anova two-way foi utilizado para a comparação entre as variáveis glicemia e tempo durante o teste, e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

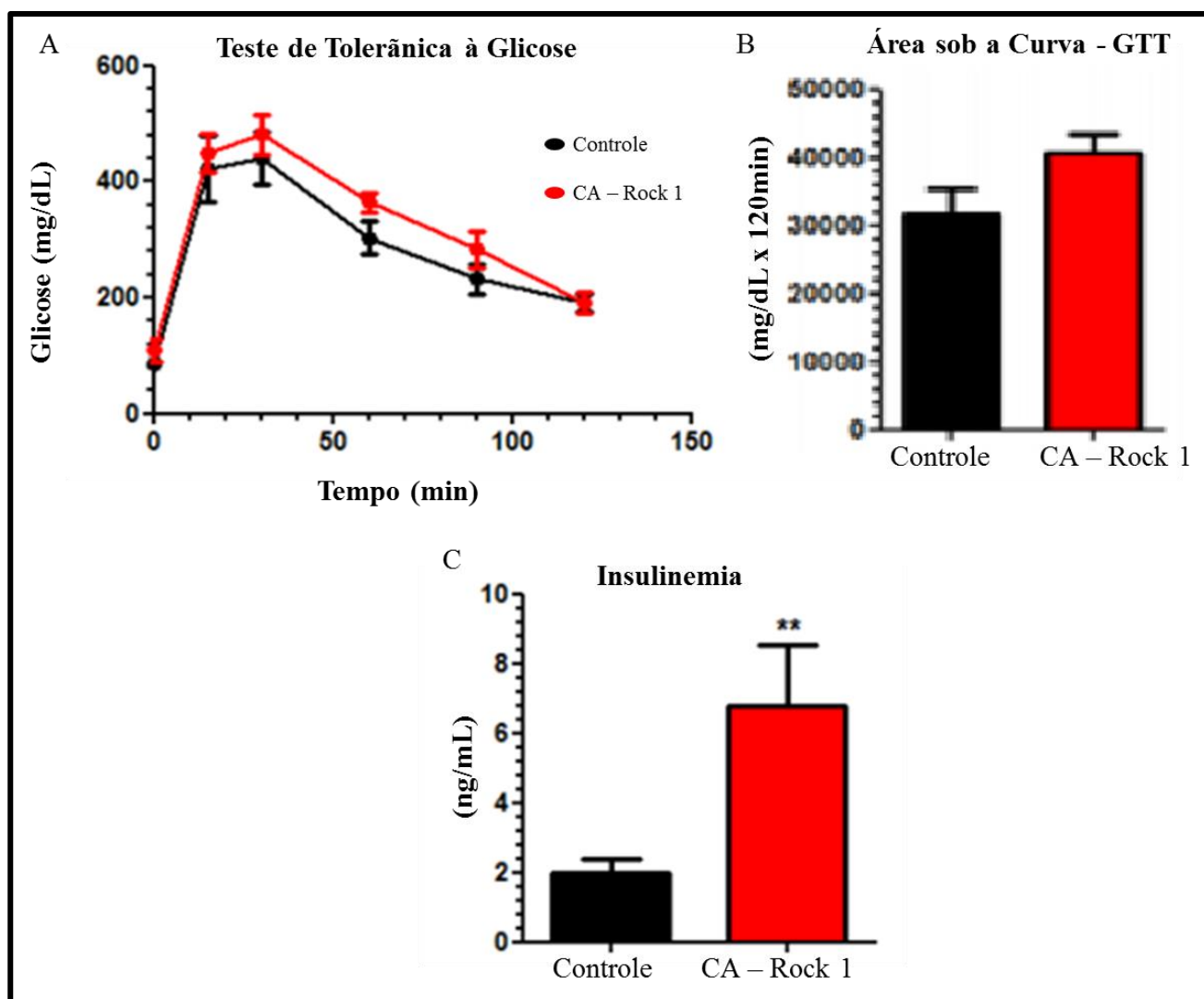


Figura 13. Dados referentes ao teste de tolerância à glicose, glicemia durante o teste (Figura A) e área sob a curva (Figura B). Antes do início do teste, em jejum, amostras de sangue foram coletadas para análise dos níveis de insulina circulante (Figura C). Para cada grupo foi utilizados 10 animais. O teste *t-student* foi utilizado para comparação entre as médias e anova *two-way* foi utilizado para a comparação entre as variáveis glicemia e tempo durante o teste. O valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

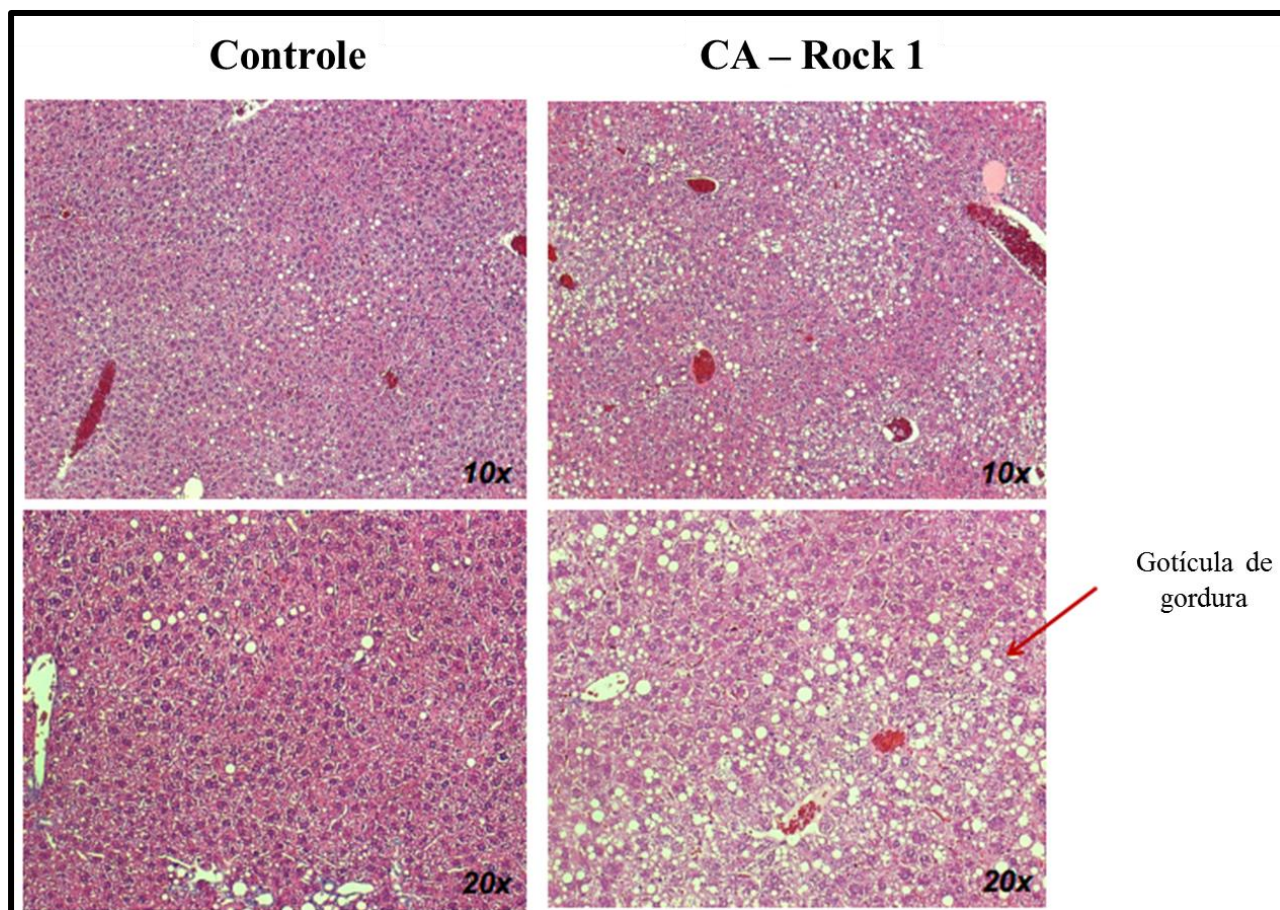


Figura 13. Análise histológica representativa do acúmulo de gordura hepático ao final do período experimental através da coloração com hematoxilina e eosina de animais controles e animais que apresentam a superativação da Rock 1). Para cada grupo foram utilizados 4 animais.

5.4 Resultados referentes a deleção da Rock 1 no fígado

Desde o início do período experimental foi visto que animais com deleção da Rock 1 no tecido hepático ganham mais peso que animais controles quando ambos são submetidos a uma dieta rica em gordura. Este maior ganho de peso para o grupo CA – Rock 1 foi aumentando de acordo com tempo decorrer do projeto até sua última semana. Após 15 semanas alimentados com dieta rica em gordura, animais com deleção da Rock 1 no fígado apresentaram redução do peso corporal (Figura 14), menor resistência à insulina (Figura 15) e menor acúmulo de gordura hepático (Figuras 16).

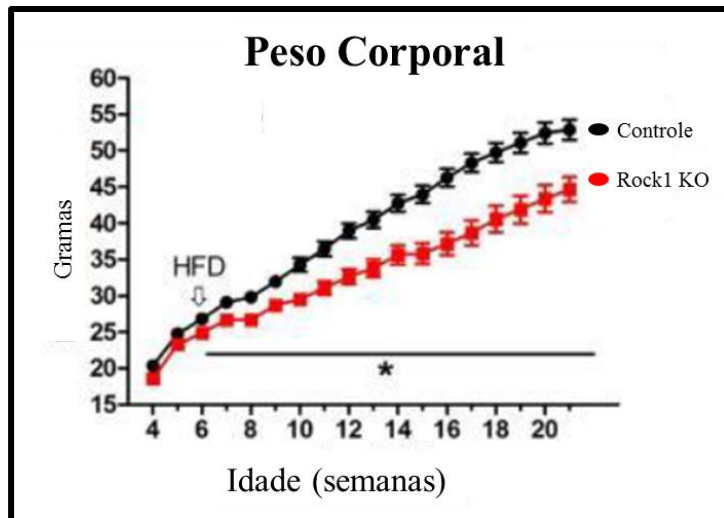


Figura 14. Análise do peso corporal de animais com deleção da Rock 1 antes e após serem submetidos a uma dieta hiperlipídica. Para cada grupo foi utilizados 10 animais. Anova two-way foi utilizado para a comparação entre as variáveis peso e tempo durante o teste, e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

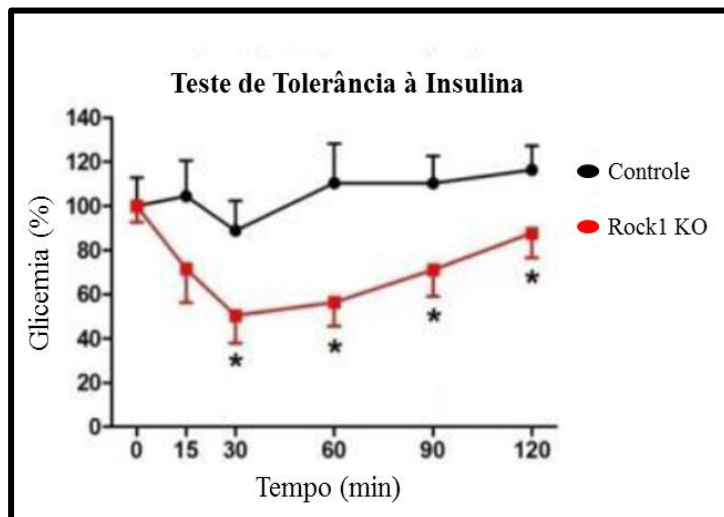


Figura 15. Teste de tolerância à insulina realizado ao final do experimento. Animais controles e animais com deleção da Rock 1 no tecido hepático (Rock 1 KO) após 15 semanas alimentados com dieta rica em gordura. Para cada grupo foi utilizados 10 animais. Anova two-way foi utilizado para a comparação entre as variáveis glicemia e tempo durante o teste, e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

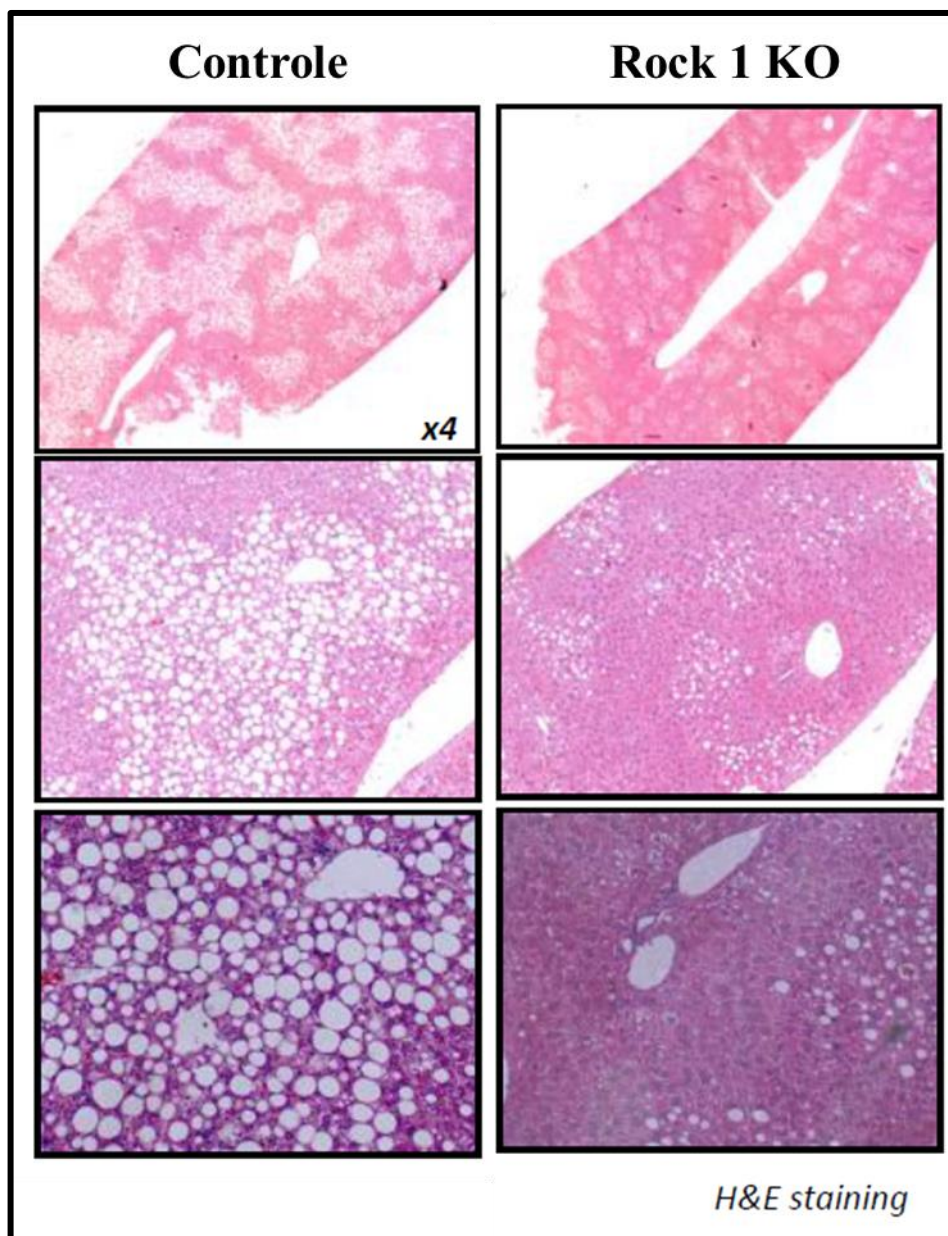


Figura 16. Análise histológica representativa do acúmulo de gordura hepático ao final do período experimental através da coloração com hematoxilina e eosina de animais controles e com deleção da Rock 1 no fígado (Rock 1 KO). Para cada grupo foram utilizados 4 animais.

5.5 Resultados referentes a superativação da Rock 1 no músculo em animais alimentados com dieta controle e hiperlipídica

5.5.1.1 Efeitos da Superativação da Rock 1 no músculo de animais alimentados com dieta controle

Com 8 semanas de idade, animais controles e animais geneticamente modificados, que apresentam a superatividade da Rock 1 no músculo, alimentados com ração controle não apresentaram diferença no peso corporal bem como na sensibilidade à insulina (Figura 17 A e B).

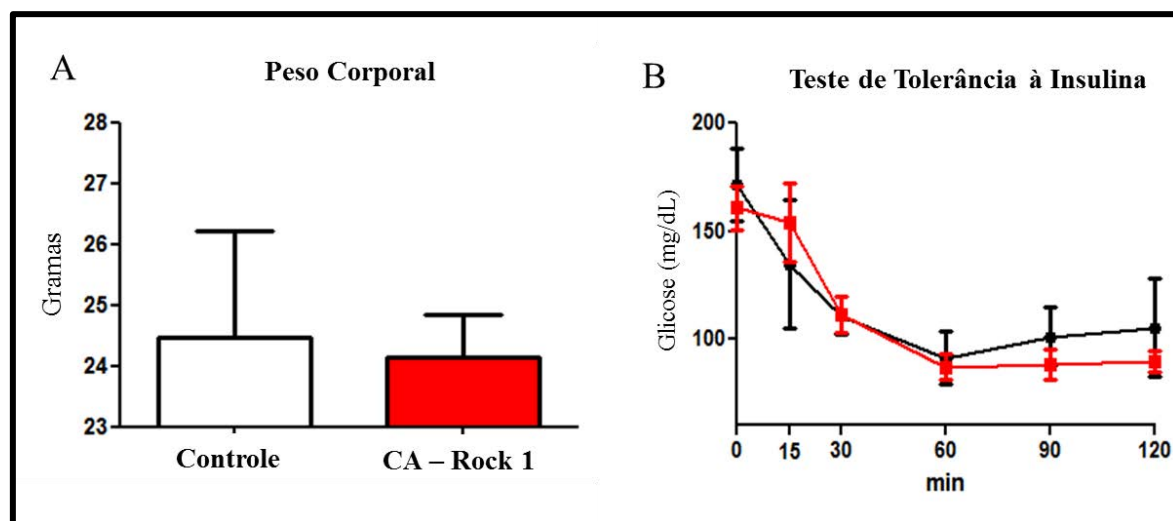


Figura 17. Análise do peso corporal (Figura A) e da sensibilidade à insulina (Figura B) de animais controles e animais que apresentam a Rock 1 superativada após 8 semanas alimentados com dieta padrão ao longo de todo o experimento. Foi utilizado 8 animais por grupo e o teste *t-student* foi utilizado para comparação entre as médias.

Após o estímulo com insulina a fosforilação de algumas proteínas chaves envolvidas na sinalização da insulina no tecido muscular mostrou que mesmo o receptor de insulina apresentando menor estímulo para o grupo CA-Rock1 (Figura 18A) a propagação do sinal da insulina parece aumentar nestes animais que mantêm a Rock 1 muscular constitutivamente ativa, este fenômeno foi observado através da fosforilação das proteínas distais da via de sinalização da insulina Akt e S6K (Figuras 13B e C respectivamente), sugerindo a ação da Rock 1 em fosforilar o IRS-1 em serina 632/635 e com isso amplificando o sinal insulínico nestes animais.

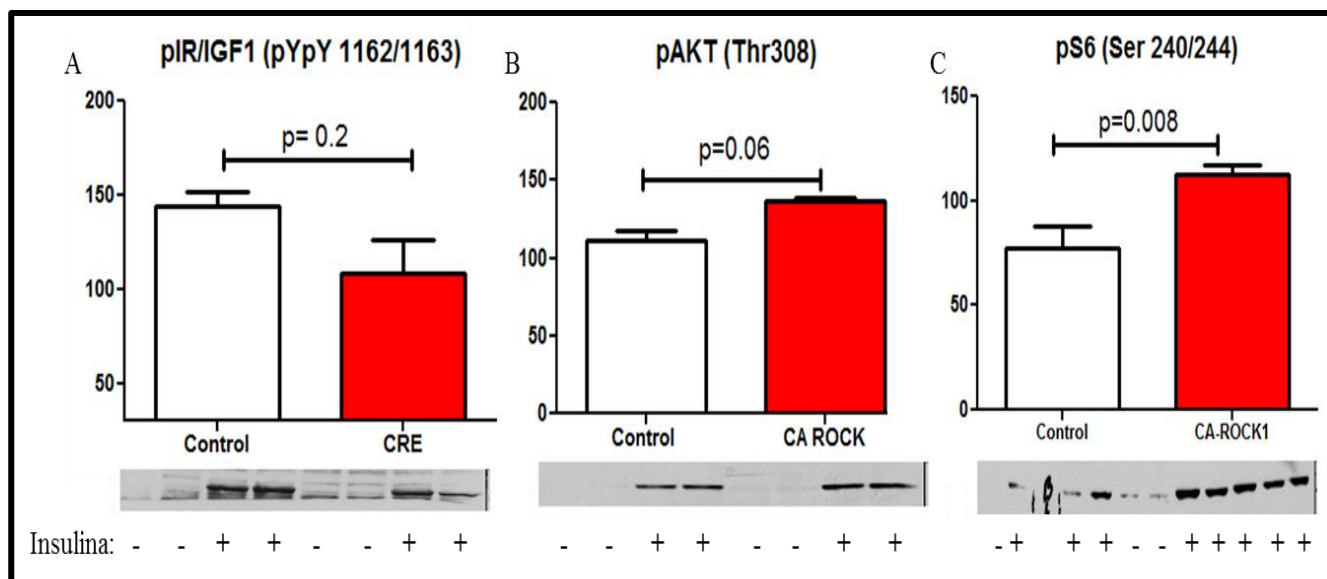


Figura 18. Análise da fosforilação de proteínas chaves da via de sinalização da insulina de animais controles e CA-Rock1. Dois animais de cada grupo foram utilizados sem estimulação de insulina e dois animais por grupo foram estimulados com insulina, com exceção da análise da proteína S6 fosforilada onde 5 animais CA-Rock 1 foram avaliados. A comparação das médias dos grupos estimulados foi realizada através do teste *t-student* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$ (Figuras A, B e C).

5.5.1.2 Efeitos da Superativação da Rock 1 no músculo de animais alimentados com dieta hiperlipídica

Camundongos C57/BL com 6 semanas de idade, após serem alimentados com dieta rica em gordura por 9 semanas, os animais não apresentaram diferença entre os grupos controle HFD e CA-Rock 1 no ganho de peso (Figura 19), bem como na tolerância à glicose (Figuras 20A e B) e sensibilidade à insulina (Figura 21A e B).

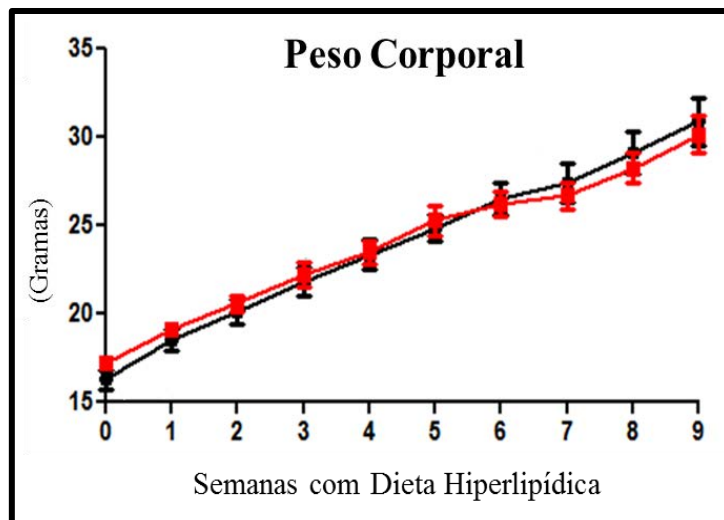


Figura 19. Análise do peso corporal após os animais começarem a ser alimentados com dieta rica em gordura durante 9 semanas. Cada grupo foi composto por 8 animais/grupo. A média dos grupos foi comparada utilizando o teste t-student e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

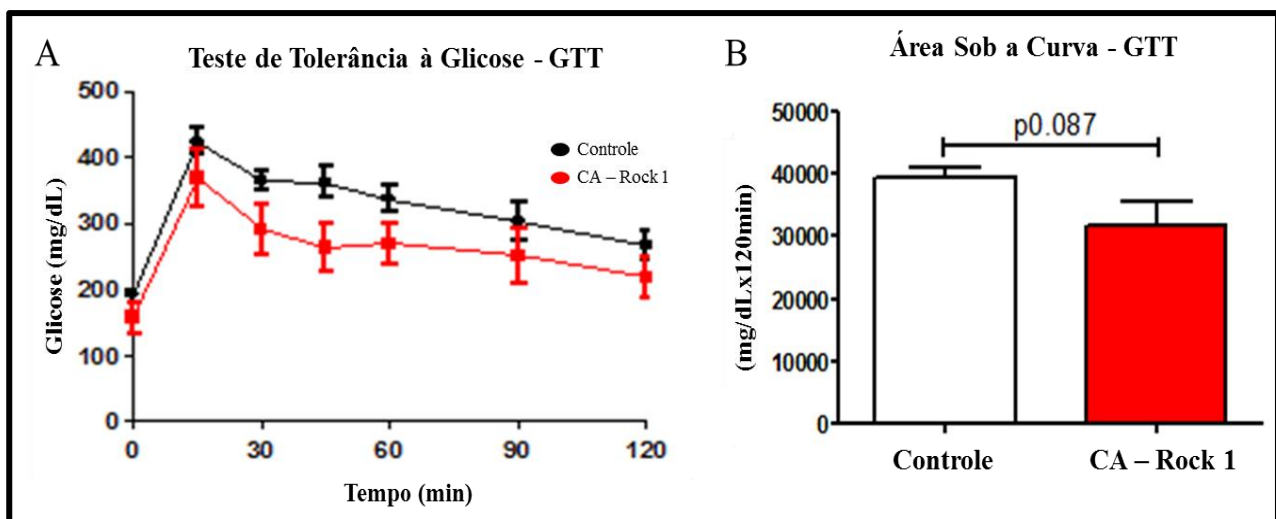


Figura 20. Análises do teste de tolerância à glicose ao final do período experimental. Cada grupo foi composto por 8 animais/grupo. A média dos grupos foi comparada utilizando o teste t-student e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

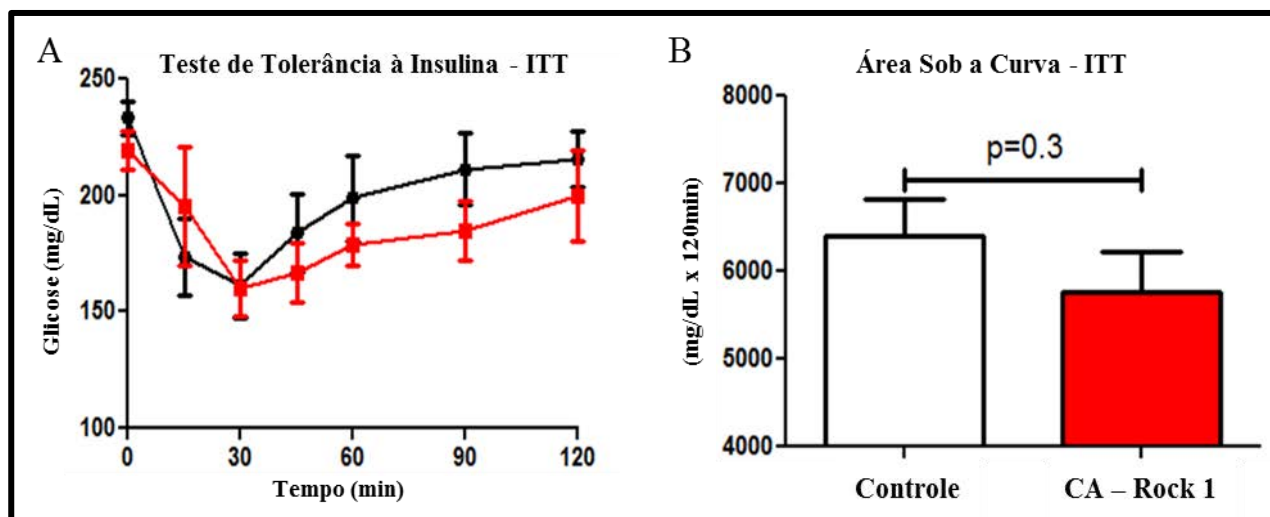


Figura 21. Análises do teste de tolerância à insulina ao final do período experimental. Cada grupo foi composto por 8 animais/grupo. A média dos grupos foi comparada utilizando o teste *t-student* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

A atividade da Rock -1 foi avaliada através da fosforilação de seu principal substrato, o MYPT-1. Foi mostrado que animais CA- Rock1 apresentam valores até duas vezes maior em relação à atividade da Rock 1 em comparação ao seu controle (Figura 22).

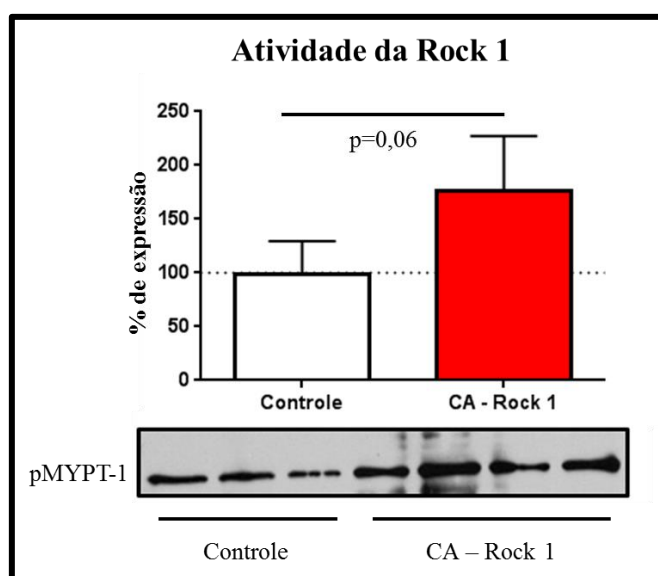


Figura 22. Análise da atividade da Rock 1 foi avaliada através da fosforilação de seu principal substrato, a proteína MYPT-1. Foram utilizados 3 animais para o grupo controle e 4 animais para o grupo CA-Rock 1. A média dos grupos foi comparada utilizando o teste *t-student* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$.

Em relação a atividade das proteínas envolvidas na sinalização da insulina, foi visto maior fosforilação somente para o IRS-1 no resíduo tirosina 608 e as proteínas Akt e AS160 apresentaram uma tendência a maior fosforilação após serem estimuladas por insulina (Figuras 23A, B, C e D).

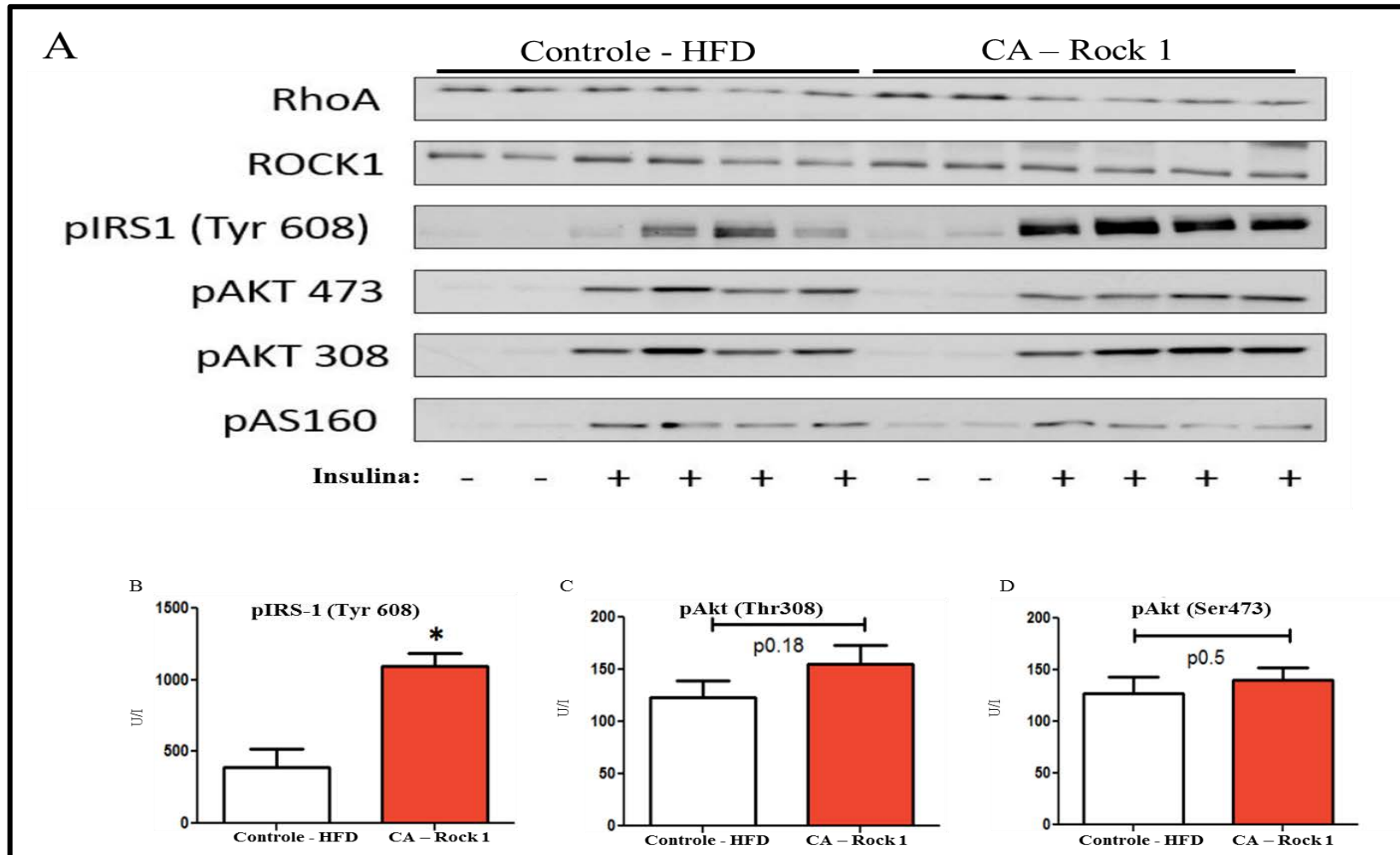


Figura 23. Análise da fosforilação de proteínas chaves da via de sinalização da insulina de animais controles e CA-Rock1 submetidos a dieta hiperlipídica (Figura A). Dois animais de cada grupo foram utilizados sem estimulação de insulina e quatro animais por grupo foram estimulados com insulina. A comparação das médias dos grupos estimulados foi realizada através do teste *t-student* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$ (Figuras B, C e D).

5.6 *Resultados referentes às respostas do exercício físico no peso corporal, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose*

Inicialmente, na fase 1 do estudo os animais foram divididos por 6 semanas em dois grupos, grupo controle e grupo obeso. Durante a fase 1 os animais do grupo obeso ganharam mais peso que os animais do grupo controle como esperado (Figura 24 A, B e C). Após seis semanas alimentados com dieta rica em gordura o teste de tolerância à insulina foi realizado para confirmação da instalação da resistência à insulina para o grupo obeso em relação ao controle (Figura 25 A e B).

Durante a fase 2, uma parte de animais do grupo obeso iniciou o protocolo de exercício físico e ao final do experimento foi possível observar que os animais obesos permaneceram adquirindo peso corporal enquanto o grupo obeso submetido ao exercício físico reduziu o ganho quando comparado ao obeso sedentário (Figura 24 A, D e E).

Após a fase 2, o teste de tolerância à insulina foi realizado novamente para análise da sensibilidade à insulina dos animais obesos após realização do protocolo de exercício físico. Foi mostrado que animais obesos após a prática de exercício físico reduzem a resistência à insulina em comparação ao obeso sedentário (Figura 25 C e D).

Ao final do estudo, a quantidade de tecido adiposo de diferentes regiões foi avaliada. Foi visto que o protocolo de treinamento físico promoveu perdas de massa adiposa nas regiões retroperitoneal, mesentérica e epididimal (Figura 26).

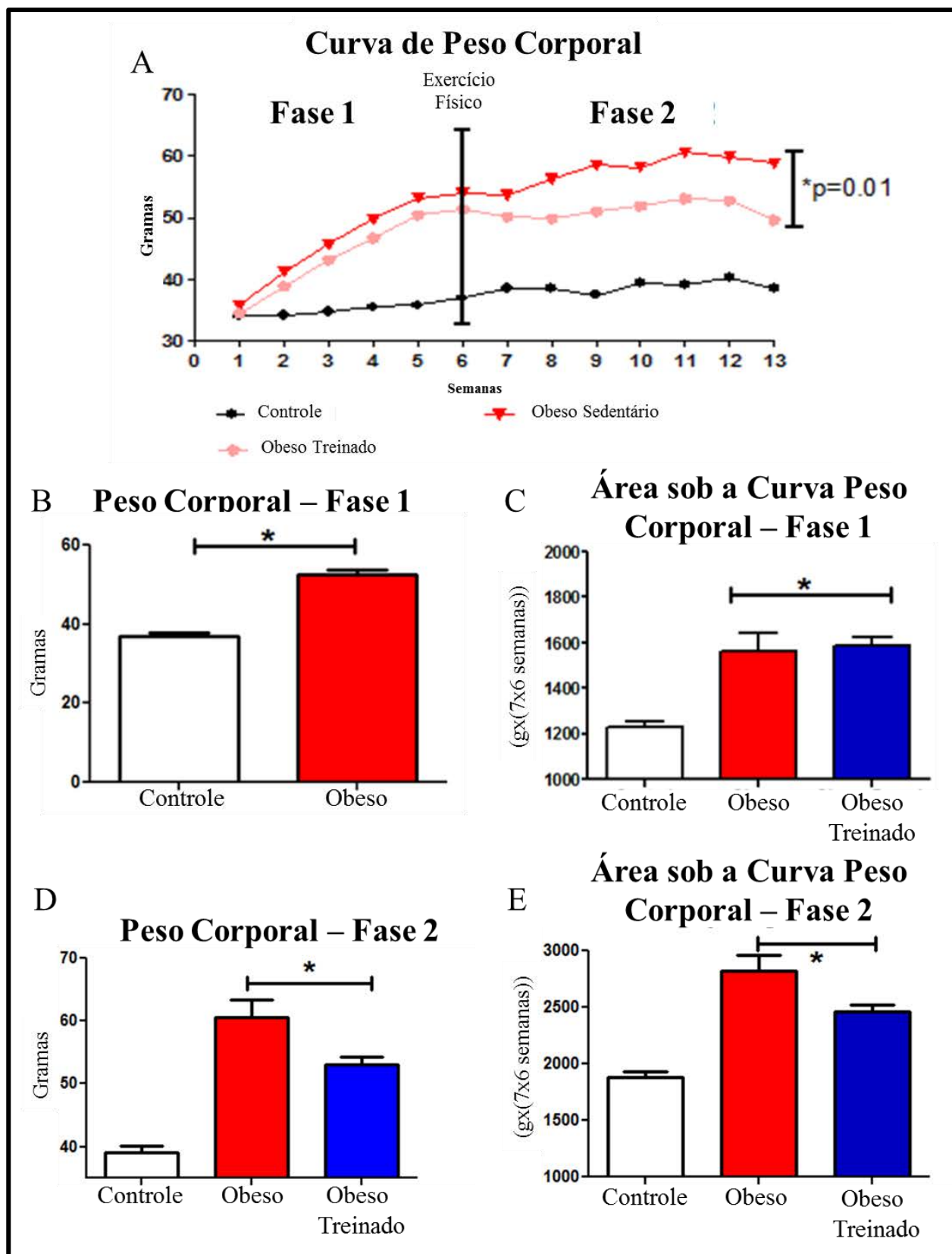


Figura 24. Análise do peso corporal dos animais ao longo de todo o experimento o qual foi dividido em 2 fases, sendo a primeira fase (6semanas) realizada apenas para a indução da resistência à insulina e a segunda fase (6semanas) para o seu tratamento. Durante a primeira fase foram utilizados 12 animais para o grupo controle e 24 animais para o grupo obeso. Na segunda fase o grupo obeso foi dividido em 2 grupos obeso e obeso treinado onde cada grupo foi composto por

12 animais. O teste *t-student* foi utilizado para comparação entre 2 médias e ANOVA *one-way* para comparações entre 3 médias obtidas durante a segunda fase do experimento.

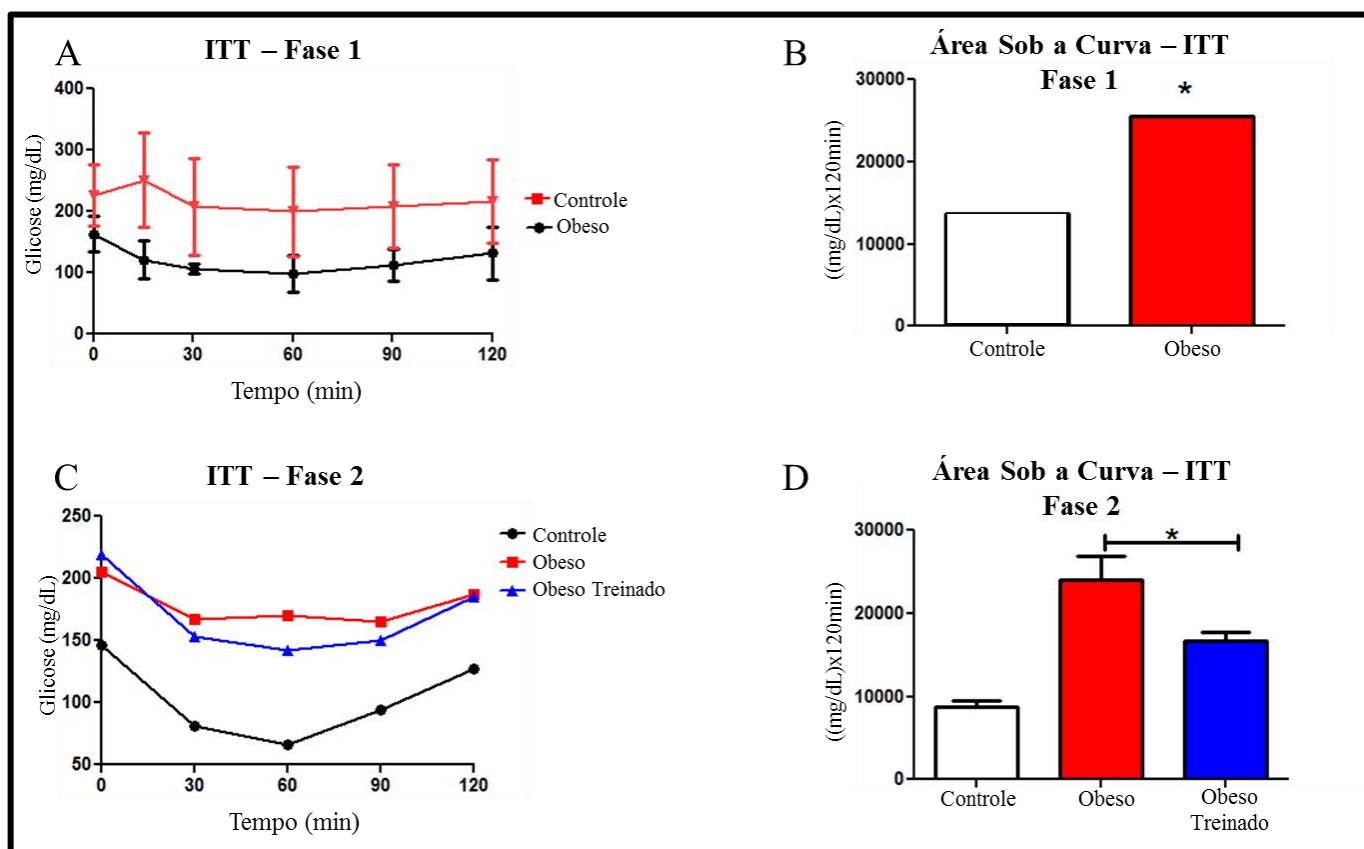


Figura 25. Análise da sensibilidade à insulina após a primeira fase (6 semanas com dieta hiperlipídica), realizada apenas para a indução da resistência à insulina e após a segunda fase (6 semanas com dieta hiperlipídica e seu tratamento com exercício físico). Durante a primeira fase foram utilizados 12 animais para o grupo controle e 24 animais para o grupo obeso. Na segunda fase o grupo obeso foi dividido em 2 grupos obeso e obeso treinado onde cada grupo foi composto por 12 animais. O teste *t-student* foi utilizado para comparação entre 2 médias e ANOVA *one-way* para comparações entre 3 médias obtidas durante a segunda fase do experimento.

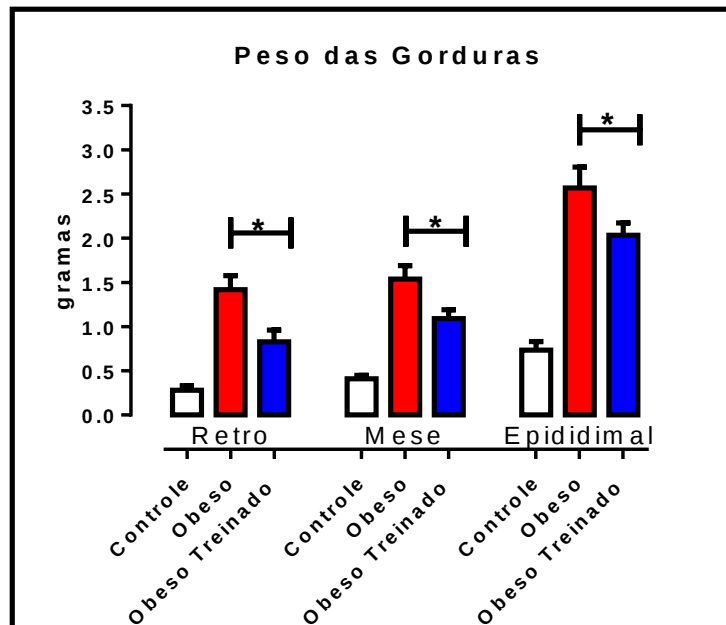


Figura 26. Análise da quantidade de tecido adiposo em diferentes regiões (retroperitoneal, mesentérica e epididimal) dos grupos controle sedentário, obeso sedentário e obeso treinado. Cada grupo foi composto por 12 animais. ANOVA *one-way* foi utilizado para comparações entre 3 médias obtidas após o término do experimento.

5.7 Metabolismo da glicose e da Rock no fígado de animais obesos submetidos ao exercício físico

Como esperado, após a prática de exercício físico proteínas chaves da sinalização da insulina (Akt, GSK3 e piruvato carboxilase (PCB)) tiveram suas funções restauradas nos animais obesos exercitados quando comparado com seu controle obeso sedentário (Figuras 27 A, B, C e H).

Através de proteínas que ativam e desativam a molécula Rock1 foi possível observar que a dieta rica em gordura colabora para maior atividade da Rock 1 no tecido hepático e que o exercício físico é capaz de inibir essa maior atividade da Rock 1 no fígado. Animais obesos apresentam maior expressão de proteína ativadora da Rock 1, a RhoA e menor expressão da proteína inibidora, a RhoE sugerindo assim que animais obesos apresentam maior atividade da Rock 1 no fígado. O exercício físico foi capaz de reverter em partes esse quadro por alterar o balanço entre as proteínas inibidora e ativadora da Rock1. O exercício promove aumento da expressão de RhoE e redução da expressão de RhoA e também reduz a expressão tanto de Rock1 bem como de Rock 2 no tecido hepático de animais obesos submetidos ao exercício físico (Figuras 27 A, D, E, F e G).

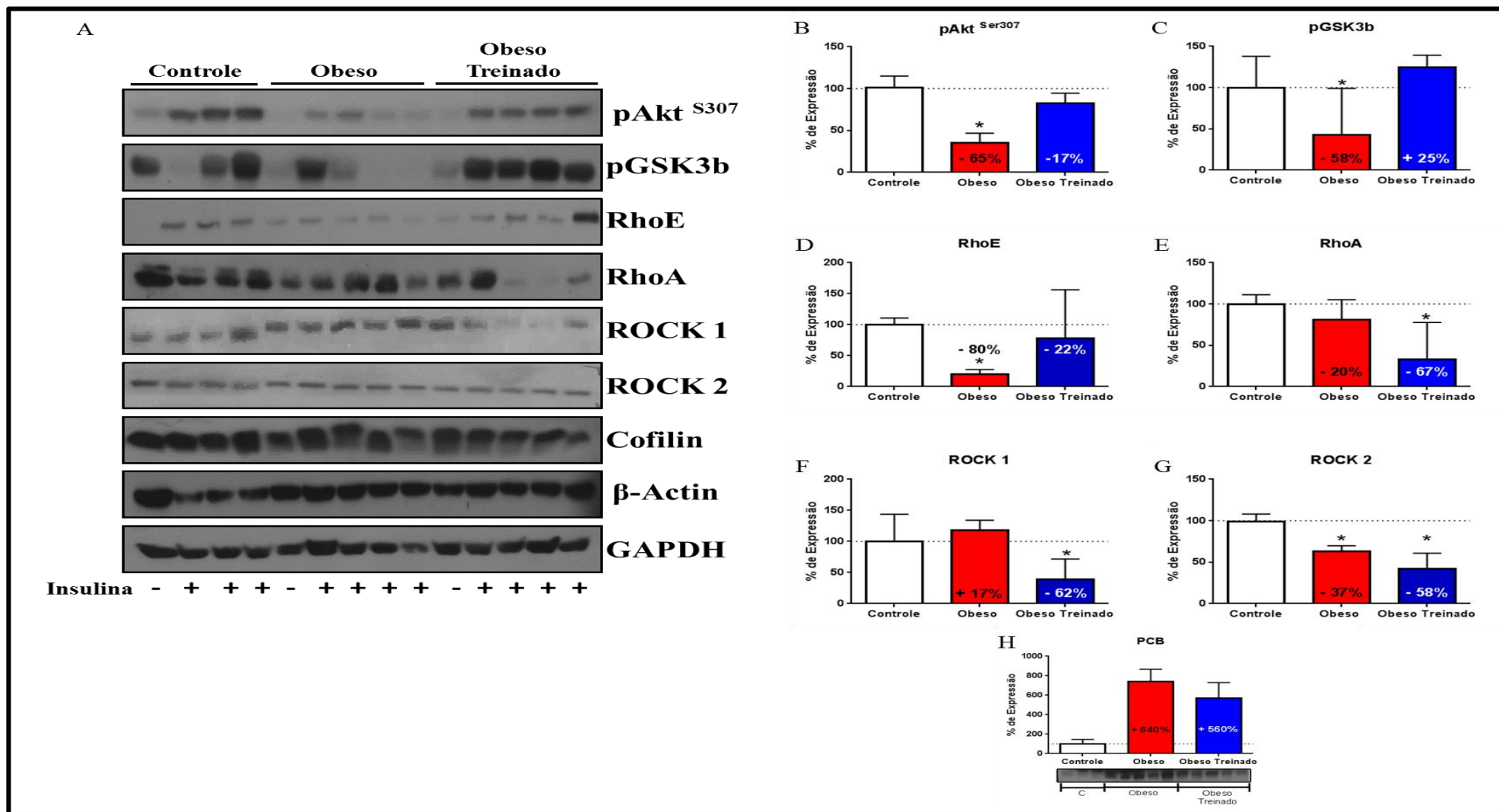


Figura 27. Análise da fosforilação de proteínas chaves da via de sinalização da insulina e do metabolismo da Rock do fígado de animais controles, obesos e obesos treinados. O grupo controle foi composto por 1 animal não estimulado com insulina e 3 animais estimulados com insulina, os grupos obeso e obeso treinado foram compostos por 1 animal sem estímulo com insulina e 4 animais estimulados com insulina. 4 animais por grupo foram estimulados com insulina. A figura A representa as bandas obtidas para cada proteína analisada. A análise foi realizada em porcentagem de variação em relação ao grupo controle. A comparação das médias dos grupos estimulados foi realizada através de Anova *one-way* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$ (Figuras B-H). Além da coloração com a solução de *ponceau* as proteínas totais de cofilina, b-actina e GAPDH foram utilizadas como controles do presente ensaio.

5.8 Metabolismo da glicose e da Rock no músculo de animais obesos submetidos ao exercício físico

Como esperado, após a prática de exercício físico proteínas chaves da sinalização da insulina (IR, IRS-1, Akt e GSK3) tiveram suas funções restauradas nos animais obesos exercitados quando comparado com seu controle obeso sedentário (Figuras 28 A-E).

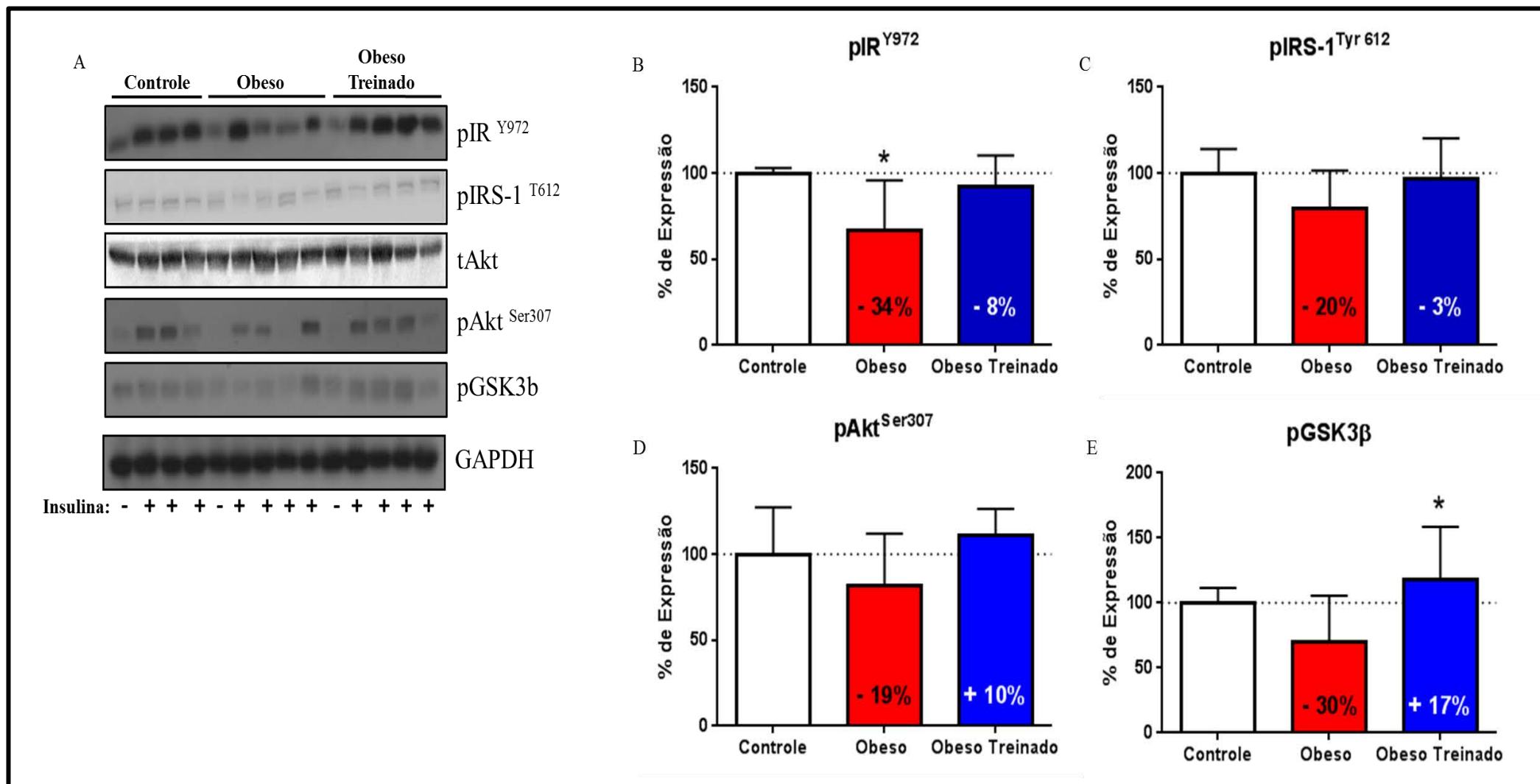


Figura 28. Análise da fosforilação de proteínas chaves da via de sinalização da insulina muscular de animais controles, obesos e obesos treinados. O grupo controle foi composto por 1 animal não estimulado com insulina e 3 animais estimulados com insulina, os grupos obeso e obeso treinado foram compostos por 1 animal sem estímulo com insulina e 4 animais estimulados com insulina. 4 animais por grupo foram estimulados com insulina. A figura A representa as bandas obtidas para cada proteína analisada. A análise foi realizada em porcentagem de variação em relação ao grupo controle. A comparação das médias dos grupos estimulados foi realizada através de Anova *one-way* e o valor de P utilizado foi de $P < 0,05$ (Figuras B-E). Além da coloração com a solução de *ponceau* as proteínas totais de Akt e GAPDH foram utilizadas como controles do presente ensaio.

O metabolismo da Rock 2 no tecido muscular é alterado em decorrência da obesidade. Animais obesos parecem apresentar menor atividade da Rock 2 neste tecido, por ter reduzida a expressão de sua molécula ativadora (RhoA) e de sua associação com Rock 2 (Figura 27 A e G), culminando em uma menor associação de Rock 2 com IRS-1 e consequentemente menor fosforilação do IRS-1 em serina 632/635. Este fenômeno foi restaurado pelo exercício físico, onde mostrou-se que animais obesos submetidos ao exercício físico apresentam restaurados seus níveis de RhoA e Rock 2 e da associação RhoA+Rock 2 e menor expressão de RhoE e de Rock 2 e da associação RhoE+Rock 2. O que culminou em maior associação Rock 2 com IRS-1 e consequentemente maior fosforilação do IRS-1 no resíduo serina 632/635 (Figura 27 A-H).

6 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença que cresce em um ritmo alarmante e está associada a resistência à insulina e desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e diabetes mellitus tipo 2. Portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à sinalização da insulina torna-se essencial para reduzir ou reverter a progressão dessa realidade epidemiológica alarmante. A resistência à insulina pode ser instalada no músculo esquelético e também no tecido hepático, contribuindo substancialmente para iniciar uma alteração na glicemia pós-prandial e, mais tarde na glicemia em jejum. Recentemente, uma nova proteína foi classificada como uma mediadora da sinalização de insulina, melhorando os seus efeitos, esta proteína é Rho-cinase (Rock), que atua sobre os tecidos periféricos (músculos esqueléticos, hepático e adiposo) e no hipotálamo, contribuindo para até 50% a ação da insulina no ambiente intracelular. Portanto, é de suma importância o melhor entendimento do modo pelo qual a Rock atua no metabolismo de animais resistentes à insulina e se as melhorias encontradas no organismo de animais obeso após o exercício físico é em decorrência ou não do metabolismo da Rock.

6.1 *Superatividade da Rock 1 no fígado*

Após submeter animais que apresentam a superatividade da Rock 1 no fígado (CA-Rock 1) a uma dieta hiperlipídica por 12 semanas, observou-se que a Rock 1 no fígado apresenta ação diferente sobre a via de sinalização da insulina quando comparado aos efeitos da Rock no tecido muscular [11, 46], adiposo [59] e hipotalâmico [12]. A Rock nos tecidos muscular, adiposo e hipotalâmico tem como função colaborar com a via de sinalização da insulina nos tecidos periféricos e com a via de sinalização da leptina no tecido hipotalâmico, por outro lado, de acordo com nossos achados, no tecido hepático a Rock parece atuar colaborando com maior ganho de peso, hiperglicemia de jejum, resistência à insulina e também com o acúmulo de gordura no fígado. Dados não publicados sugerem à Rock 1 um papel mais específico para a via lipogênica enquanto à Rock 2 um papel mais específico para a homeostase da glicose no tecido hepático.

6.2 Deleção da Rock 1 no fígado

Depois de submeter animais com deleção da Rock 1 no tecido hepático a uma dieta rica em gordura, observou-se que estes animais responderam de maneira contrária quando se superativou a Rock 1 no fígado. Estes animais com deleção da Rock 1 no fígado apresentaram menor peso corporal, aumento da sensibilidade à insulina e menor acúmulo de gordura no fígado. Assim sendo, parece que a Rock 1 quando exerce sua função no tecido hepático é responsável por reduzir a sensibilidade a insulina periférica, maior ganho de peso e consequentemente maior acúmulo de gordura hepática. Ainda nenhum estudo evidenciou a real mecanística da Rock 1 no fígado, mas uma hipótese criada foi a de que a Rock 1 poderia estar envolvida com o receptor hepático X beta ou alfa (LXR receptor). Este receptor está envolvido no metabolismo de lipídico hepático e atua em modular a transcrição do *sterol regulatory element binding protein -1c* (SREBP-1c) [78]. Animais nocautes para o gene LXR α alimentados com dieta rica em colesterol desenvolveram doenças hepáticas graves, tais como: insuficiência hepática, EHNA, degeneração do hepatócito degeneração, etc. Ainda, quando há deleção da LXR β em animais submetidos a uma dieta rica em lipídios, estes animais se tornaram imunes às alterações expostas acima [79]. Portanto, uma vez que o LXR α e β estão envolvidos na lipogênese hepática, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na tentativa de desvendar a mecanística entre Rock 1 e LXR. Para isso iniciou-se análises de associação entre estas proteínas e de acordo com dados ainda não publicados parece que a Rock 1 se liga no LXR e assim promove o estímulo para a lipogênese hepática (resultados ainda não finalizados).

6.3 Superativação da Rock 1 no tecido muscular

Normalmente, camundongos magros têm níveis de glicose no sangue dentro do intervalo de normalidade, por isso, quando nós usamos animais magros que possuem a Rock 1 superativada no músculo esquelético eles não apresentaram uma diferença significativa no peso corporal e também no teste de sensibilidade à insulina. Quando as proteínas da via de sinalização da insulina foram avaliadas, foi visto que mesmo sem apresentar diferença na sensibilidade à insulina, animais que possuem a Rock 1 superativada mesmo apresentando menor fosforilação do IR tendem a apresentar maior fosforilação da Akt e S6, esse fenômeno

pode ser explicado, em partes, pela função da Rock em fosforilar o IRS-1 e que consequentemente fosforilar a Akt e S6.

6.4 *Superativação da Rock 1 no tecido muscular de animais obesos*

Após 16 semanas, alimentados com dieta hiperlipídica, animais que apresentam a superatividade da Rock 1 no tecido muscular não apresentaram diferença no peso corporal, mas mostraram uma tendência a melhor tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Para explicar este fenômeno, as principais proteínas envolvidas na sinalização da insulina foram avaliadas e foi possível observar que mesmo sem a alteração na expressão da RhoA e Rock 1 a fosforilação do IRS-1 em tirosina foi expressivamente maior para o grupo CA-Rock1 o que culminou em uma tendência a maior fosforilação de ambas as formas da Akt. No presente estudo, mesmo não apresentando alterações nas expressões de RhoA e Rock 1 a confirmação da superatividade da Rock 1 se deve ao aumento da fosforilação do seu principal substrato, o MYPT-1. Através da fosforilação do MYPT-1 pode-se estimar a atividade da Rock 1 [65], assim neste estudo observou-se que mesmo sem alteração na expressão da molécula ativadora da Rock 1 (RhoA) e também mesmo sem alteração da própria Rock 1 houve aumento de sua atividade, por termos encontrado maior fosforilação do MYPT-1. Assim, sugere-se que mesmo o estímulo com insulina ter respondido de maneira mais discreta para o grupo CA-Rock 1, este grupo conseguiu uma tendência a reverter a situação pela direta fosforilação do IRS-1 através da molécula Rock o que vai de encontro com os dados de Furukawa em 2005 [11].

6.5 *Metabolismo da Rock no tecido hepático de animais obesos submetidos ao exercício físico*

Inicialmente, o presente estudo partiu do princípio de que o exercício físico promove adaptações na via de sinalização da insulina hepática de indivíduos obesos a modo de reduzir a formação de nova glicose para a corrente sanguínea e com isso colaborar no tratamento do diabetes mellitus, este efeito benéfico do exercício físico pode ser encontrado em diversos estudos [8, 64, 80, 81]. O modo como estas adaptações ocorrem na via insulínica ainda não foi

totalmente desvendado na literatura, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se estas adaptações são decorrentes ou não do metabolismo da Rock.

Após indução da resistência a insulina através da administração de dieta hiperlipídica, um grupo de animais foi submetido a prática de exercício físico. Como esperado, animais alimentados com dieta rica em gordura desenvolveram obesidade e resistência à insulina e após serem submetidos ao exercício físico por 6 semanas apresentaram melhora na sensibilidade à insulina. Esta melhora na sensibilidade a insulina periférica do obeso treinado em relação ao obeso sedentário foi demonstrada através da maior fosforilação da Akt e GSK3 e menor fosforilação da piruvato carboxilase para o grupo obeso treinado quando comparado ao obeso sedentário, o mesmo foi encontrado por diversos autores [8, 14, 64].

O principal intuito do presente estudo foi avaliar o metabolismo da Rock tanto em tecido hepático, bem como em muscular em resposta ao exercício físico de animais obesos e observar se estas respostas benéficas obtidas do exercício físico na sensibilidade à insulina poderia ser também em decorrência da Rock. Neste estudo, foi demonstrado que animais obesos quando possuem a Rock1 super ativada, eles apresentam respostas nocivas ao organismo, como: maior ganho de peso, resistência à insulina e maior acúmulo de gordura hepática. Por outro lado, quando a Rock 1 é deletada do tecido hepático foi encontrado resultados inversos, como: menor ganho de peso, maior sensibilidade à insulina e menor acúmulo de gordura hepática. Assim sendo, a hipótese do presente projeto foi que em resposta ao exercício físico pudesse ocorrer uma redução da atividade da Rock 1 no tecido hepático de animais obesos.

Através dos achados do presente estudo, pode-se sugerir que o exercício físico pode contribuir na sinalização da insulina hepática por reduzir a atividade da Rock 1 hepática. A molécula Rock pode ser ativada pela molécula RhoA ou inibida pela RhoE, neste estudo foi visto que animais obesos apresentam redução em média de 80% da RhoE em relação aos animais controles e após serem submetidos ao protocolo de treinamento físico estes animais conseguem restaurar a expressão da RhoE em até 40% em relação ao grupo obeso sedentário, ou seja, somente em média de 20% de redução quando comparado ao controle magro. Em relação a proteína ativadora da Rock, a RhoA não foi observada diferença entre os grupos sedentários controle e obeso, mas quando o grupo obeso foi submetido ao exercício físico foi possível observar uma redução próxima de 67% da RhoA em comparação ao controle sedentário.

Dados não publicados sugerem à Rock 1 como principal no metabolismo lipídico e à Rock 2 no metabolismo glicídico. No presente estudo, não foi observado efeito da dieta hiperlipídica na expressão de Rock 1, mas quando animais obesos foram submetidos ao exercício físico foi visto que estes animais reduziram a expressão de Rock 1 no fígado em torno de 62% quando comparado ao controle sedentário.

6.6 *Metabolismo da Rock no tecido muscular de animais obesos submetidos ao exercício físico*

Desde 1887, quando Chauveau e Kaufaman relataram que o tecido muscular, através de sua contração, poderia auxiliar na homeostase glicêmica por conseguir, sem intermédio da insulina, captar glicose circulante, estudos relacionando a papel da contração muscular na homeostase glicêmica veem sendo bastante estudados [82]. Em 1972, Froberg [83] mostrou que apenas uma única sessão de exercício físico pode promover efeitos benéficos para o metabolismo glicídico e logo depois Karlsson et al., (1974) [84] mostraram que esses efeitos gerados pelo exercício possuem respostas transitórias e assim, a prática regular faz com que estes efeitos sejam mantidos.

Os estudos mais importantes e pioneiros que mostraram o efeito do exercício físico na captação de glicose em nível molecular foi realizado por Wojtaszewski e colaboradores em 1999 [20] e Luciano e colaboradores em 2002 [49]. Wojtaszewski e co-autores mostraram que animais mesmo com deleção do receptor de insulina conseguiram aumentar a captação de glicose após o exercício físico, colaborando com estes resultados Luciano e colaboradores mostraram que ratos magros após uma sessão de exercício físico de natação apresentaram maior captação de glicose e que este fenômeno aconteceu em decorrência da maior fosforilação do IRS-1 em tirosina, e consequentemente, aumentou a atividade da PI3-K e Akt culminando na maior captação de glicose e que não houve diferença na fosforilação do receptor de insulina. A partir desses achados, pode-se concluir que o receptor de insulina não é crucial na captação de glicose após o exercício físico, uma vez que esta prática consegue fosforilar diretamente o IRS-1. Mas, o modo como o exercício físico consegue fosforilar diretamente o IRS-1, e consequentemente, colaborar para a atividade da via de sinalização da insulina ainda não foi desvendado. Neste sentido, a molécula Rock parece exercer importante

função para melhor entendimento deste fenômeno, uma vez que a Rock consegue fosforilar diretamente o IRS-1 e a partir disso aumentar a captação de glicose no tecido muscular [11].

No presente estudo, foi possível mostrar os efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina e como esperado esta prática promoveu efeitos benéficos nesta via. Este dado foi confirmado através do aumento da fosforilação de proteínas chaves envolvidas na captação de glicose, a partir disso o objetivo do presente estudo foi investigar se este fenômeno pode ter sido atribuído ao menos em parte ao metabolismo da Rock.

Neste estudo, foi evidenciado que a obesidade atua reduzindo a atividade da Rock 2 no tecido muscular e que o exercício físico promove alterações suficientes para reverter este quadro. Foi visto que a obesidade reduziu tanto a expressão da RhoA em 47% bem como da Rock 2 em 46% e também da associação entre estas moléculas (RhoA + Rock 2) em 54%. Uma vez que a obesidade reduziu a expressão de RhoA e sua associação com Rock 2, como consequência, a obesidade então reduziu também a associação da Rock 2 com IRS-1 em 37% e consequentemente reduziu a fosforilação do IRS-1 em serina 632/635 em 26%, culminando na redução da sensibilidade periférica à insulina que foi avaliada através do teste de tolerância à insulina.

Por sua vez, como esperado o exercício físico conseguiu promover alterações suficientes para melhorar a sensibilidade periférica a insulina em animais obesos. A principal hipótese deste trabalho foi investigar se esta melhora era em decorrência ou não da participação da Rock 2. Foi visto que o exercício físico restaurou a expressão da molécula ativadora da Rock, a RhoA e de Rock 2 em 100% e a associação entre RhoA + Rock 2 em 10%. O exercício também reduziu a expressão da molécula inibidora da Rock, a RhoE em 19% e sua associação com a Rock 2 em 45%. A associação da Rock 2 com o IRS-1 foi 157% mais elevada para o grupo obeso treinado o que promoveu um aumento de 55% da fosforilação do IRS-1 em serina 632/635 para este grupo quando comparado com seu grupo controle obeso sedentário, o que pode ter colaborado para maior fosforilação da Akt e consequentemente para suas demais respostas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, sugere-se que a Rock 1 e Rock 2 possuem diferentes funções em diferentes tecidos. No fígado, a Rock 1 desenvolve papel nocivo ao organismo por colaborar com a resistência à insulina e consequentemente com o

aumento da atividade lipogênica. No tecido muscular, a Rock 2 desenvolve papel benéfico ao organismo por colaborar com a captação de glicose, e consequentemente beneficiando a sensibilidade à insulina. O exercício físico, por sua vez, reduz a atividade da Rock no tecido hepático através do controle de suas moléculas ativadoras e inibidoras e no tecido muscular o exercício físico também através do controle do metabolismo de RhoA e RhoE promove aumento da atividade da Rock o que culminou na maior fosforilação do IRS-1 em serina 632/635 e então maior atividade da Akt e suas demais respostas.

8 REFERÊNCIAS

1. Joslin EP: **The prevention of diabetes mellitus.** *J Am Med Assoc* 1921, **76**:79–84.
2. Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE: **Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women.** *Ann Intern Med* 1995, **122**:481–6.
3. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC: **Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men.** *Diabetes Care* 1994, **17**:961–9.
4. Masters RK, Reither EN, Powers DA, Yang YC, Burger AE, Link BG: **The impact of obesity on US mortality levels: The importance of age and cohort factors in population estimates.** *Am J Public Health* 2013, **103**:1895–1901.
5. Hossain P, Kavar B, El Nahas M: **Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge.** *N Engl J Med* 2007, **356**:213–5.
6. Tao Z, Shi A, Zhao J: **Epidemiological Perspectives of Diabetes.** *Cell Biochem Biophys* 2015.
7. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Da Silva AS, De Souza CT, Guadagnini D, Carvalho BM, Caricilli AM, Katashima CK, Carvalho-Filho M a., Hirabara S, Curi R, Velloso L a., Saad MJ a, Carnevalheira JBC: **Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice.** *Diabetes* 2013, **62**:466–470.
8. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva a. SR, Bertoli FC, Colantonio E, D’Almeida V, Pauli JR: **Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss.** *J Cell Physiol* 2012, **227**:2917–2926.
9. Prada PO, Ropelle ER, Moura RH, Souza CT De, Pauli JR, Rocco S a, Rittner R, Franchini KG, Cintra DE, Velloso L a, Carnevalheira B, Saad MJ a: **Glucose Tolerance and Insulin Action in High-Fat Diet – Fed Mice.** *Diabetes* 2009, **58**(December):2910–9.
10. Matos a., Ropelle ER, Pauli JR, Frederico MJS, De Pinho R a., Velloso L a., De Souza CT: **Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice.** *Acta Physiol* 2010, **198**:61–69.

11. Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, Kim HJ, Lee YH, Kaibuchi K, Kahn BB, Masuzaki H, Kim JK, Lee SW, Kim YB: **Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis.** *Cell Metab* 2005, **2**:119–129.
12. Huang H, Kong D, Byun KH, Ye C, Koda S, Lee DH, Oh B-C, Lee SW, Lee B, Zabolotny JM, Kim MS, Bjørbæk C, Lowell BB, Kim Y-B: **Rho-kinase regulates energy balance by targeting hypothalamic leptin receptor signaling.** *Nature Neuroscience* 2012:1391–1398.
13. Oliveira NRC, Marques SO, Luciano TF, Pauli JR, Moura LP, Caperuto E, Pieri BLS, Engelmann J, Scaini G, Streck EL, Lira FS, Pinho R a., Ropelle ER, Silva ASR, De Souza CT: **Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 α protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner.** *Mediators Inflamm* 2014, **2014**.
14. Pauli LS, Ropelle ECC, de Souza CT, Cintra DE, da Silva AS, Rodrigues B a, Moura LP, Marinho R, Oliveira V, Katashima CK, Pauli JR, Ropelle ER: **Exercise training decreases MAPK phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice.** *J Physiol* 2014, **6**:1325–1340.
15. Saltiel AR, Kahn CR: **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** *Nature* 2001, **414**:799–806.
16. White MF: **The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action.** *Mol Cell Biochem* 1998, **182**:3–11.
17. Patti ME, Corvera S: **The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes.** *Endocr Rev* 2010, **31**:364–395.
18. Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR: **A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance.** *Mol Cell* 1998, **2**:559–569.
19. Zisman a, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki a, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB: **Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance.** *Nat Med* 2000, **6**:924–928.
20. Wojtaszewski JFP, Higaki Y, Hirshman MF, Michael MD, Dufresne SD, Kahn CR, Goodyear LJ: **Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice.** *J Clin Invest* 1999, **104**:1257–1264.
21. Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ: **A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle.** *Mol Cell* 2001, **7**:1085–1094.
22. Shefi-Friedman L, Wertheimer E, Shen S, Bak a, Accili D, Sampson SR: **Increased IGFR activity and glucose transport in cultured skeletal muscle from insulin receptor null mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **281**:E16–E24.
23. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL, Carolina N: **Insulin Receptor Phosphorylation , Insulin Receptor Substrate-I Phosphorylation , and Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Are Decreased in Intact Skeletal Muscle Strips from Obese Subjects.** 1995, **95**(May):2195–2204.

24. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H: **Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM.** *Mol Cell Biochem* 1998, **182**:153–60.
25. Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN: **The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance.** *Endocr Rev* 2010, **31**:25–51.
26. Lumeng CN, Saltiel AR: **Review series Inflammatory links between obesity and metabolic disease.** *Life Sci* 2011, **121**:2111–2117.
27. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT De, Ropelle ER: **Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**.
28. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho M a, Moraes JC, De Souza CT, Velloso L a, Carnevali JBC, Saad MJ a: **Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats.** *J Physiol* 2008, **586**:659–671.
29. Bredella MA, Lin E, Brick DJ, Gerweck A V., Harrington LM, Torriani M, Thomas BJ, Schoenfeld D a, Breggia A, Rosen CJ, Hemphill LC, Wu Z, Rifai N, Utz AL, Miller KK: **Effects of GH in women with abdominal adiposity: A 6-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Eur J Endocrinol* 2012, **166**:601–611.
30. Moore MC, Cherrington a D: **Regulation of net hepatic glucose uptake: interaction of neural and pancreatic mechanisms.** *Reprod Nutr Dev* 1996, **36**:399–406.
31. Giacca A, Fisher SJ, Shi ZQ, Gupta R, Lickley HL a, Vranic M: **Importance of peripheral insulin levels for insulin-induced suppression of glucose production in depancreatized dogs.** *J Clin Invest* 1992, **90**:1769–1777.
32. Lauro D, Kido Y, Castle a L, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, Accili D: **Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue.** *Nat Genet* 1998, **20**:294–298.
33. Schwartz MW, Woods SC, Jr DP, Seeley RJ, Baskin DG: **Control of food intake.** *Nature* 2000, **404**:661–671.
34. Fisher SJ, Kahn CR: **Insulin signaling is required for insulin 's direct and indirect action on hepatic glucose production.** *J Clin Invest* 2003, **111**:463–468.
35. Mukai H, Toshimori M, Shibata H, Kitagawa M, Shimakawa M, Miyahara M, Sunakawa H, Ono Y: **PKN associates and phosphorylates the head-rod domain of neurofilament protein.** *J Biol Chem* 1996, **271**:9816–9822.
36. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S: **ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice.** *FEBS Lett* 1996, **392**:189–193.
37. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L: **A novel serine/threonine kinase binding the ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes.** *J Biol Chem* 1995, **270**:29051–29054.
38. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ: **RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:4219–4229.

39. Taylor P, Street M, Wt L, Mack NA, Georgiou M, Mack NA, Georgiou M: **apicobasal cell polarity The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity**. 2014(April 2015):37–41.
40. Chong LD, Traynor-Kaplan a, Bokoch GM, Schwartz M a: **The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells**. *Cell* 1994, **79**:507–513.
41. Takai Y, Kaibuchi K, Sasaki T, Tanaka K, Shirataki H, Nakanishi H: **Rho small G protein and cytoskeletal control**. *Princess Takamatsu Symp* 1994, **24**:338–50.
42. Ridley AJ: **Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho**. *J Cell Sci Suppl* 1994, **18**:127–31.
43. Farah S, Agazie Y, Ohan N, Ngsee JK, Liu XJ: **A rho-associated protein kinase, ROKalpha, binds insulin receptor substrate-1 and modulates insulin signaling**. *J Biol Chem* 1998, **273**:4740–4746.
44. Begum N, Sandu O a, Ito M, Lohmann SM, Smolenski A: **Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate-1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells**. *J Biol Chem* 2002, **277**:6214–6222.
45. Lee DH, Shi J, Jeoung NH, Kim MS, Zabolotny JM, Lee SW, White MF, Wei L, Kim Y-B: **Targeted Disruption of ROCK1 Causes Insulin Resistance in Vivo**. *J Biol Chem* 2009, **284**:11776–11780.
46. Chun K-H, Choi K-D, Lee D-H, Jung Y, Henry RR, Ciaraldi TP, Kim Y-B: **In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011, **300**:E536–E542.
47. Nakamura Y, Kaneto H, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Node K, Hori M, Yamasaki Y: **Marked increase of insulin gene transcription by suppression of the Rho/Rho-kinase pathway**. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **350**:68–73.
48. Zhou H, Li Y: **Long-term diabetic complications may be ameliorated by targeting Rho kinase**. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2011:318–330.
49. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CRO, Carvalheira JBC, Peres SB, Reis M a B, Saad MJ a, Boschero a. C, Velloso L a.: **Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway**. *Eur J Endocrinol* 2002, **147**:149–157.
50. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, Braun B: **Exercise and type 2 diabetes: The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: Joint position statement**. *Diabetes Care* 2010, **33**.
51. Aronson D, Violan M a, Dufresne SD, Zangen D, Fielding R a, Goodyear LJ: **Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle**. *J Clin Invest* 1997, **99**:1251–1257.
52. Hardin DS, Edwards J, Johnson a NN, Timothy W, Carolina S: **Athletes : Effects on Blood Flow and of GLUT 4 in Skeletal Muscles ***. 1995(March):2437–2446.

53. Hellénus ML, Brismar KE, Berglund BH, de Faire UH: **Effects on glucose tolerance, insulin secretion, insulin-like growth factor 1 and its binding protein, IGFBP-1, in a randomized controlled diet and exercise study in healthy, middle-aged men.** *J Intern Med* 1995, **238**:121–130.
54. Berger M, Hagg S, Ruderman NB: **Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake.** *Biochem J* 1975, **146**:231–238.
55. Goodyear LJ, Hirshman MF, Horton ES: **Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1991, **261**:E795–799.
56. Holloszy JO, Booth FW: **Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle.** *Annu Rev Physiol* 1976, **38**:273–291.
57. Chibalin a V, Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook a, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: **Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:38–43.
58. Wojtaszewski JF, Hansen BF, Gade, Kiens B, Markuns JF, Goodyear LJ, Richter E a: **Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle.** *Diabetes* 2000, **49**:325–331.
59. Lee S-H, Huang H, Choi K, Lee DH, Shi J, Liu T, Chun KH, Seo J a, Lima IS, Zabolotny JM, Wei L, Kim Y-B: **ROCK1 isoform-specific deletion reveals a role for diet-induced insulin resistance.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014, **306**:E332–43.
60. Bonjorn VM, Latour MG, Bélanger P, Lavoie J-M: **Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon.** *J Appl Physiol* 2002, **92**:188–194.
61. Postic C, Dentin R, Girard J: **Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis.** *Diabetes Metab* 2004, **30**:398–408.
62. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H: **Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1 – PGC-1 a interaction.** *Nature* 2003, **423**(May):550–555.
63. Aoyama H, Daitoku H, Fukamizu A: **Nutrient control of phosphorylation and translocation of Foxo1 in C57BL/6 and db/db mice.** *Int J Mol Med* 2006, **18**:433–439.
64. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJS, de Pinho R a, Velloso L a, De Souza CT: **Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats.** *J Physiol* 2009, **587**(Pt 9):2069–2076.
65. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, Chang BHJ, Schumacker PT, Danesh FR: **Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells.** *Cell Metab* 2012, **15**:186–200.
66. Zambrowicz BP, Imamoto a, Fiering S, Herzenberg L a, Kerr WG, Soriano P: **Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:3789–3794.
67. Kos CH: **Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models.** *Nutr Rev* 2004, **62**(6 Pt 1):243–6.

68. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB: **Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance.** *Nat Med* 2000, **6**:924–8.
69. Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto C a., Kokubun E, Brum PC: **Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007, **34**:760–765.
70. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M: **Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies.** *J Clin Endocrinol Metab* 1989, **68**:374–8.
71. DuBois M, Gilles K a., Hamilton JK, Rebers P a., Smith F: **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Anal Chem* 1956, **28**:350–356.
72. Scott AM, Atwater I, Rojas E: **A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans.** *Diabetologia* 1981, **21**:470–5.
73. Nunes WMS, Mello MAR De: **Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation.** *Brazilian Arch Biol Technol* 2005, **48**:541–548.
74. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–54.
75. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ a, Velloso L a.: **Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus.** *Endocrinology* 2005, **146**:4192–4199.
76. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680–5.
77. JUNQUEIRA, Luis Carlos U.; JUNQUEIRA L, S MM: *Técnicas Básicas de Citologia E Histologia.* São Paulo; 1983.
78. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N: **Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:2991–3000.
79. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ: **Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.** *Cell* 1998, **93**:693–704.
80. De Moura LP, Sponton ACDS, de Araújo MB, Dalia RA, Pauli JR, Rostom de Mello MA: **Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats.** *Lipids Health Dis* 2013, **12**:29.
81. De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Velloso LA: **Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice.** *J Physiol* 2010, **588**(Pt 12):2239–2253.

82. CHAUVEAU, A.; KAUFMANN M: **Expériences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles en repos et en travail.** *C R Hebd Seances Acad Sci* 1887, **104**:1126–1132.
83. Fröberg SO: **Effects of training and of acute exercise in trained rats.** *Metabolism* 1971, **20**:1044–51.
84. Karlsson J, Nordesjö LO, Saltin B: **Muscle glycogen utilization during exercise after physical training.** *Acta Physiol Scand* 1974, **90**:210–7.

9 PRODUÇÃO ACADÊMICA (2013-2015)

- a. Artigos científicos públicos em co-autoria: 12 Artigos
- 9.1.1 Artigos científicos publicados como primeiro autor: 3 artigos internacionais, sendo 2 artigos A2.
- 9.1.2 Resumos publicados em anais de congresso: 22 Resumos publicados em periódicos nacionais e internacionais

RESEARCH

Open Access

Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats

Leandro Pereira de Moura^{1,2,3*}, Amanda Christine da Silva Sponton¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, José Rodrigo Pauli^{1,2} and Maria Alice Rostom de Mello¹

Abstract

Background: Obesity, oxidative stress and inflammation, by triggering insulin resistance, may contribute to the accumulation of hepatic fat, and this accumulation by lipotoxicity can lead the organ to fail. Because obesity is growing at an alarming rate and, worryingly, in a precocious way, the present study aimed to investigate the effects of moderate physical training performed from childhood to adulthood on liver fat metabolism in rats.

Methods: Twenty rats that were 28 days old were divided into two groups: control (C) and trained (T). The C Group was kept in cages without exercise, and the T group was submitted to swimming exercise for 1 hour/day, 5 days/week from 28 to 90 days of age (8 weeks) at 80% of the anaerobic threshold determined by the lactate minimum test. At the end of the experiment, the body weight gain, insulin sensitivity (glucose disappearance rate during the insulin tolerance test), concentrations of free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG) and hepatic lipogenic rate were analyzed. For the statistical analysis, the Student t-test was used with the level of significance preset at 5%.

Results: The T group showed lower body weight gain, FFA concentrations, fat accumulation, hepatic lipogenic rate and insulin resistance.

Conclusion: The regular practice of moderate physical exercise from childhood can contribute to the reduction of obesity and insulin resistance and help prevent the development of accumulation of hepatic fat in adulthood.

Keywords: Moderate exercise, Metabolic health, Hepatic fat accumulation

Background

Obesity is a major public health problem and is a risk factor for the development of many fatal diseases, particularly type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1-4]. The prevalence of NAFLD in obese individuals increases significantly, reaching 50-75% [5]. The increase in the prevalence of NAFLD is presumed to parallel the increased prevalence of obesity and diabetes in all age groups.

Described by Ludwig and colleagues in 1980 [6], NAFLD is clinically characterized by the deposition of

fat droplets in liver hepatocytes [5,7] and varies from simple macrovesicular steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis and cirrhosis. NAFLD may be the main cause of morbidity and mortality related to liver diseases, with the potential to progress to liver failure. However, it should be noted that the progression to fibrosis or cirrhosis appears to occur only in patients with evidence of steatohepatitis.

The etiopathogenesis of NAFLD includes oxidative stress, inflammation and insulin resistance and a consequently increased synthesis of triglycerides and retention in the hepatocyte, leading to macrovesicular steatosis. Mitochondrial dysfunction also assumes an important role, leading to lower lipid oxidation and contributing to fat accumulation and injury in hepatocytes. The attack of the organ also involves oxidative stress, causing peroxidation of membrane lipids in the hepatocytes and cytokine production, especially

* Correspondence: leandropereira@gmail.com

¹UNESP/Rio Claro, Bioscience Institute, Physical Education Department, São Paulo State University, Rio Claro, Brazil

²UNICAMP/Uimeira, Applied Sciences Faculty, Sports Science Course, Campinas State University, Campinas, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

RESEARCH

Open Access

Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats

Leandro Pereira de Moura^{1†}, Luciana Santos Souza Pauli^{2†}, Denrys Esper Cintra², Claudio Teodoro de Souza⁴, Adelino Sanchez Ramos da Silva³, Rodolfo Marinho², Maria Alice Rostom de Melo¹, Eduardo Rochete Ropelle² and José Rodrigo Pauli^{1,2,5*}

Abstract

It is now commonly accepted that chronic inflammation associated with obesity during aging induces insulin resistance in the liver. In the present study, we investigated whether the improvement in insulin sensitivity and insulin signaling, mediated by acute exercise, could be associated with modulation of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in the liver of old rats. Aging rats were subjected to swimming for two 1.5-h long bouts, separated by a 45 min rest period. Sixteen hours after the exercise, the rats were sacrificed and proteins from the insulin signaling pathway were analyzed by immunoblotting. Our results show that the fat mass was increased in old rats. The reduction in glucose disappearance rate (Kitt) observed in aged rats was restored 16 h after exercise. Aging increased the content of PTP-1B and attenuated insulin signaling in the liver of rats, a phenomenon that was reversed by exercise. Aging rats also increased the IR β /PTP-1B and IRS-1/PTP-1B association in the liver when compared with young rats. Conversely, in the liver of exercised old rats, IR β /PTP-1B and IRS-1/PTP-1B association was markedly decreased. Moreover, in the hepatic tissue of old rats, the insulin signaling was decreased and PEPCCK and G6Pase levels were increased when compared with young rats. Interestingly, 16 h after acute exercise, the PEPCCK and G6Pase protein level were decreased in the old exercised group. These results provide new insights into the mechanisms by which exercise restores insulin signalling in liver during aging.

Introduction

Aging in both humans and rodents is associated with increased fasting and postprandial plasma insulin levels [1,2] and decreased in glucose tolerance [2,3] suggesting an insulin-resistant state. Dysregulation of hepatic glucose homeostasis in aging associated with obesity is mainly caused by increased gluconeogenesis. Suppression of hepatic glucose output has been shown to be an effective therapeutic approach for controlling serum high level glucose in type 2 diabetes. Insulin is an important hormone for suppressing liver gluconeogenesis mainly through Akt mediated phosphorylation and inactivation of Foxo1, a transcription factor that stimulates

expression of gluconeogenic genes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase (PEPCK and G6Pase) [4-6].

Great efforts have been directed to study the mechanism of insulin resistance in liver related with aging and obesity. In this scenario, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has emerged as key phosphatase, induced by inflammation, that has been shown to be a negative regulator of the insulin signal transduction in insulin resistant states. PTP1B knockdown in rodents protects against diabetes and obesity, the two important metabolic diseases in modern society. Not surprisingly, PTP1B is a highly regarded target of the pharmaceutical industry in the treatment of these disorders [7].

PTP-1B can diminish or block insulin action by tyrosine dephosphorylation of the insulin receptor (IR), rendering it inactive, or by dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1/2) inhibiting their interactions with downstream signaling molecules in periphery and central nervous system [8-10]. Consistent with

* Correspondence: rodrigopauli@yahoo.com.br

†Equal contributors

¹Universidade Estadual Paulista, UNESP, Curso de Pós-Graduação em Ciências da Motricidade Humana, Rio Claro, SP, Brazil

²Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Curso de Pós-Graduação em Nutrição, Esporte e Metabolismo, UNICAMP, Limeira, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Research Article

Open Access

Hepatic Steatosis Markers in Diabetic Rats Trained at the Aerobic/Anaerobic Transition

Leandro Pereira de Moura^{1*}, Ricardo José Gomes², José Alexandre Curiacos de Almeida Leme¹, Michel Barbosa de Araújo¹ and Maria Alice Rostom de Mello¹¹São Paulo State University, Physical Education Department- Rio Claro/SP, Brazil²Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Educação Física- Santos/SP, Brazil

Abstract

Aims: To analyze the effects of exercise performed at the aerobic/anaerobic transition (Lan) on Non-Alcoholic Hepatic Steatosis (NAHS) markers in type 1 diabetic rats.**Methods:** Adult Wistar rats were separated into four groups: Sedentary Control (SC), Trained Control (TC), Sedentary Diabetic (SD) and Trained Diabetic (TD). The trained groups swam supporting workloads equivalent to the Lan for one hour/day, five days/week, for eight weeks. Body weight, serum albumin concentrations, glucose concentrations, Free Fatty Acid (FFA) concentrations, NAHS markers (Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) and total lipid concentrations in the liver were analyzed.**Results:** The diabetic groups showed higher serum glucose concentrations and more weight loss compared to the controls, although the TD group was less affected than the SD group. Training resulted in a decrease in serum glucose levels in the diabetic rats. The NAHS markers, total lipid concentrations in the liver and serum albumin concentrations did not differ between the groups. However, the diabetic animals had higher serum FFA levels than the controls.**Conclusion:** Physical training at Lan attenuates weight loss and improves serum glucose homeostasis in diabetic animals. In addition, serum ALT and AST enzymes proved to be adequate markers of lipid levels in the livers in this animal model.**Keywords:** Diabetes mellitus; Non-alcoholic hepatic steatosis; Physical training

Introduction

Diabetes Mellitus (DM) results from a reduction in either the secretion or the action of insulin and causes impairment in both glucose storage and glucose use by cells. According to World Health Organization (WHO), there were approximately 170 million people with diabetes around the world in 2002, and it has been predicted that by the year 2030 this number may double [1].

Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) can result in serious complications that reduce both quality of life and life expectancy [2]. These complications include retinopathy, renal disease, atherosclerotic macrovascular disease, debilitating neuropathies and hepatic diseases, such as Hepatic Steatosis (HS).

HS is characterized by an accumulation of fat in the liver that exceeds 5% of the total weight [3] and can result from alcohol consumption or other factors [4]. Non-Alcoholic Hepatic Steatosis (NAHS) is one of the most common causes of chronic hepatic diseases, followed by hepatitis C and alcoholic HS.

DM1 can lead to an imbalance of the lipid profile [5,6]. According to Carew et al. [7], the imbalance of serum lipoprotein concentrations promotes clearance of cholesterol from peripheral tissues to the liver for catabolism and excretion. When transfer to the liver is high and the rate of catabolism is low, fat accumulation may occur in this organ, resulting in NAHS. Markers of this condition, such as rises in the serum concentrations of the hepatic transaminases Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT), are used as indicators of DM in epidemiological studies [8].

Many attempts have been made to develop drugs that target the symptoms of NAHS. However, due to the lack of drugs that treat NAHS specifically, patients are instructed to both reduce the amount of lipids

and carbohydrates in their diet and practice regular physical activity to increase their daily energy expenditure [9]. Physical exercise is considered to be of great importance in the treatment of DM [10]. Such intervention is known to improve glucose tolerance and lipid profiles because muscle contraction activates the insulin signaling pathway [11,12] and promotes glucose uptake, even in the absence of insulin, therefore improving glucose and lipid metabolism. However, there is controversy concerning the most effective exercise protocols for diabetic patients. In a study performed by Harrison and Neuschwander-Tetri [13], exercise training resulted in gradual and healthy weight loss, as well as an improvement of diabetic NAHS symptoms from a histological point of view. However, in other studies performed by the same authors, sharp weight loss resulted in a worsening of the clinical condition of the patients, predisposing them to hepatic fibrosis. Therefore, the present study aims to analyze the effects of physical exercise an intensity equivalent to the aerobic/anaerobic metabolic transition on NAHS markers in type 1 diabetic rats.

Material and Methods

Animals

Young male Wistar rats (60 days old at the start of the experiment)

*Corresponding author: Leandro Pereira de Moura, São Paulo State University, Physical Education Department, Rio Claro, SP, Brazil; Tel: +55(19)8197-9999; E-mail: leandropereira@gmail.com

Received October 30, 2013; Accepted November 29, 2013; Published December 07, 2013

Citation: de Moura LP, Gomes RJ, de Almeida Leme JAC, de Araújo MB, de Mello MAR (2013) Hepatic Steatosis Markers in Diabetic Rats Trained at the Aerobic/Anaerobic Transition. J Liver 2: 137. doi:10.4172/2167-0889.1000137

Copyright: © 2013 de Moura LP, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.