

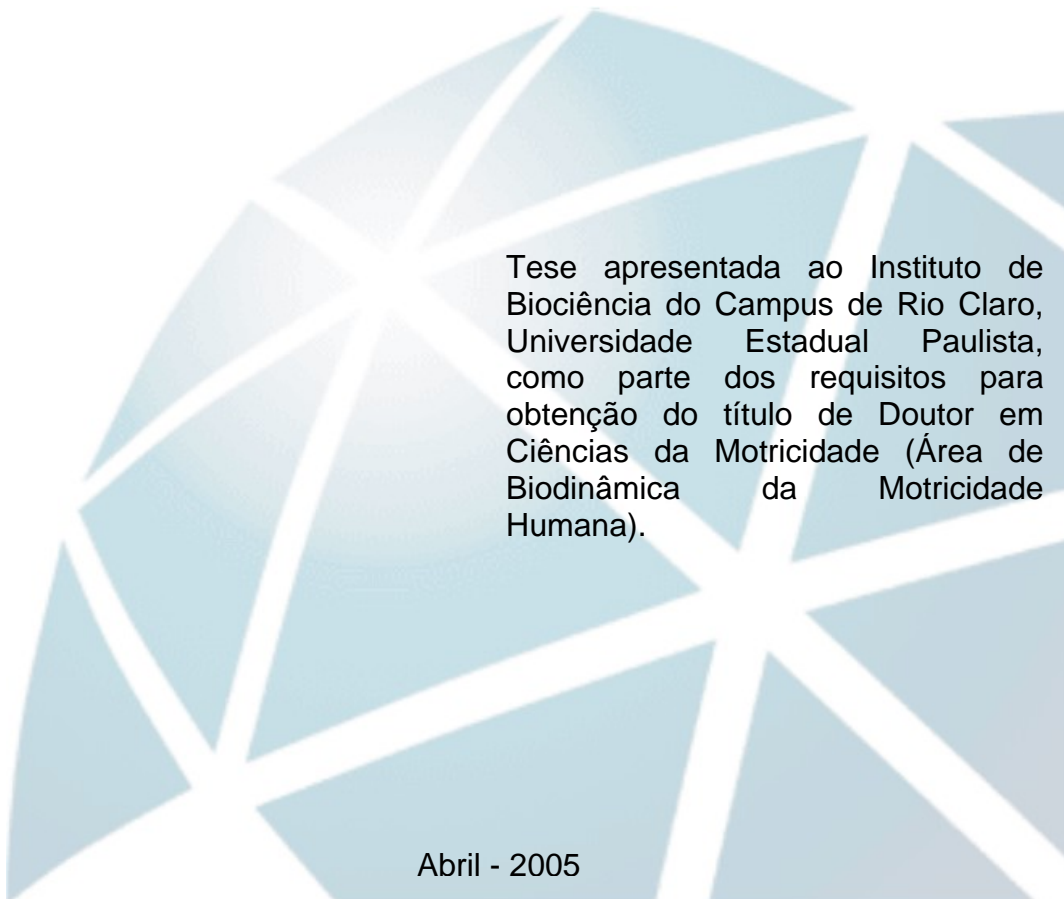
---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE  
ÁREA DE BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

---

# METABOLISMO GLICÍDICO EM RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO POR DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

WILTON MARLINDO SANTANA NUNES

A large, abstract graphic in the background of the lower half of the page, consisting of overlapping light blue and white geometric shapes that form a stylized, organic pattern.

Tese apresentada ao Instituto de Biociência do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade (Área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

Abril - 2005

**METABOLISMO GLICÍDICO EM RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO  
POR DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

**WILTON MARLINDO SANTANA NUNES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade (Área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

**RIO CLARO**

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 2005

**METABOLISMO GLICÍDICO EM RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO  
POR DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

**WILTON MARLINDO SANTANA NUNES**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Alice  
Rostom de Mello**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências da  
Motricidade (Área de Biodinâmica da  
Motricidade Humana).

**RIO CLARO**  
Estado de São Paulo  
Abril - 2005

## DEDICATÓRIA

A Deus pelo imenso amor.

A minha Mãe Maria Cassimira Santana Nunes pela educação na verdade e pelas orações.

A esposa Silvana Furlan Nunes pelo grande amor e compreensão e apoio nas horas mais difíceis.

As filhas Larissa e Bruna pelos sorrisos e carinho sempre disponível.

Aos meus irmãos Welington e Rosane Nunes pelo apoio.

Ao amigo Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva pelo incentivo e grande amizade.

## AGRADECIMENTOS

A Maria Alice R. de Mello pela paciência, dedicação incomum e presteza em sempre me ajudar com carinho e disposição.

A Soni Alves Furlan, Helio Furlan, Eliana Furlan e Tatiana Furlan pelo carinho e cuidado para com as minhas filhas.

Aos Técnicos do laboratório Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio pela amizade, paciência e exatidão no executar das técnicas.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angelina pelo carinho e atenção.

À Prof<sup>a</sup> Lílian pelo auxílio e orientação como coordenação da pós.

Aos Colegas de orientação (Camilinha, Chicão, Fabrício, Fúlvia) e todos aqueles que de alguma forma colaboraram na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pelo exemplo de dedicação e carinho e por ceder o laboratório de metabolismo do IB- UNICAMP.

## RESUMO

Este estudo visou analisar o metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos submetidos a desnervação bem como a resposta do animal como um todo à insulina exógena e ao exercício. Os animais foram tratados de acordo com o Guide for care use of laboratory animals. (National Research Council, 1996). Para isso foram realizados 3 experimentos. No primeiro, ratos adultos (3 a 5 meses) foram submetidos à secção do nervo isquiático da pata direita. Observou-se redução da captação de glicose pelo músculo sóleo isolado da pata desnervada após 3 e 7 dias mas não após 28 dias em relação a animais controles íntegros. Não houve diferença após 3 e 7 dias na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral em relação ao animal controle. Houve aumento da captação de glicose na pata contralateral 28 dias após a desnervação. Verificou-se que após 28 dias de desnervação, não houve reinervação do nervo isquiático. A taxa de remoção da glicose em resposta à insulina exógena após 28 dias de desnervação foi superior à de animais controle íntegros e aquela observada após 3 e 7 dias de desnervação. No segundo, ratos nas mesmas condições, após 48 h de desnervação iniciaram programa de natação 1h/dia, 5dias/semana, durante 28 dias. Ratos desnervados submetidos ao exercício mostraram maior taxa de remoção da glicose sanguínea em resposta à insulina exógena comparados aos sedentários e a animais controle íntegros. O exercício elevou a captação e a oxidação da glicose pelo músculo contralateral e pelo desnervado assim como pelo músculo de animais controles íntegros. Esses resultados sugerem que alterações restritas do metabolismo glicídico muscular influenciam a homeostase glicêmica do animal. Além disso, o exercício melhora o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado. No terceiro, ratos adultos nas mesmas condições, do primeiro estudo, tiveram avaliada a secreção de

insulina por ilhotas pancreáticas isoladas e incubadas em presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,3; e 16,7 mM). Houve aumento na secreção da insulina nas concentrações de glicose de 8,3 e 16,7 mM após 28 dias de desnervação em relação às mesmas concentrações do grupo controle íntegro. Esses resultados indicam aumento de sensibilidade das ilhotas com concentrações altas de glicose, o que pode ser útil na presença da homeostase glicêmica. O conjunto dos resultados dos 3 estudos sugere que a imobilização por desnervação interfere não só no metabolismo da glicose no músculo esquelético desnervado como também em outros tecidos. Os mecanismos dessa interação precisam, ainda, ser investigados.

Palavras – chaves: Desnervação, Metabolismo Glicídico e Músculo Esquelético.

## SUMÁRIO

	Página
<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTO.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
2.1 Secreção de insulina.....	11
2.2 Ação periférica da insulina.....	13
2.3 Desnervação muscular, exercício e insulina.....	15
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
<b>4. CAPÍTULO I: METABOLISMO GLICIDICO EM RATOS SUBMETIDOS A DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....</b>	<b>23</b>
4.1 Resumo.....	23
4.2 Abstract.....	25
4.3 Introdução.....	26
4.4 Material e Método.....	29
4.5 Resultados.....	32
4.6 Discussão.....	34
4.7 Conclusão.....	38
4.8 Agradecimentos.....	39
4.9 Referências.....	40
4.9.1 <i>Figuras</i> .....	45
<b>5. CAPÍTULO II: METABOLISMO GLICIDICO EM RATOS SUBMETIDOS A DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1 Resumo.....	48
5.2 Abstract.....	50
5.3 Introdução.....	52
5.4 Material e Método.....	56
5.5 Resultados.....	59
5.6 Discussão.....	61

5.7 Conclusão.....	65
5.8 Agradecimentos.....	66
5.9 Referências.....	67
5.9.1 <i>Figuras</i> .....	73
<b>6. CAPÍTULO III: EFEITO DA DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA E NO METABOLISMO DA GLICOSE EM RATOS.....</b>	<b>76</b>
6.1 Resumo.....	76
6.2 Abstract.....	79
6.3 Introdução.....	81
6.4 Material e Método.....	85
6.5 Resultados.....	90
6.6 Discussão.....	92
6.7 Conclusão.....	95
6.8 Agradecimentos.....	96
6.9 Referências.....	97
6.9.1 <i>Figuras</i> .....	102
<b>7. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>105</b>
<b>8. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>111</b>
<b>9. REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>112</b>
<b>10. ABSTRACT.....</b>	<b>133</b>
<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE II.....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICE III .....</b>	<b>167</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A contração muscular é um mecanismo fisiológico fundamental para o ser humano, onde se faz necessária à busca de substratos energéticos que são importantes para a sua própria existência. Sabe-se que a glicose é o principal substrato energético para o organismo e por isso, tem-se estudado exaustivamente o seu comportamento nas várias situações metabólicas. Nos dias de hoje situações como, fraturas de membros superiores ou inferiores, secção neuronal periférica e entorses de qualquer natureza provenientes de acidentes, tanto na prática desportiva, lazer ou profissional, levam o indivíduo a permanecer por vários dias em uma situação de imobilidade tanto total quanto parcial. Esta situação traz uma série de implicações metabólicas e estruturais na musculatura esquelética no local onde se fez necessário à imobilização.

Sabe-se que a imobilização do tecido muscular por desnervação causa inúmeras alterações locais na musculatura onde a captação de glicose é diminuída, como também a síntese de glicogênio, a sensibilidade à insulina, a atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose e da expressão gênica dos transportadores de glicose (GLUT-4) desencadeando o processo de hipotrofia (CODERRE et al., 1992; HENRIKSEN et al., 1991).

Por outro lado, faltam informações na literatura sobre em que alterações locais, decorrentes da imobilização por desnervação, poderiam influenciar o organismo como um todo.

Sabe-se que os tecidos muscular e adiposo são os dois principais sítios de ação hipoglicemiante da insulina e que esses dois tecidos juntos compõe quase 65% de todo o peso corporal (GUYTON e HALL, 2002). Dessa forma qualquer alteração na sensibilidade e/ou responsividade desses tecidos ao hormônio, pode causar comprometimento da homeostase glicêmica. Apesar da importância do problema, poucos estudos abordam em conjunto os efeitos sistêmicos e locais da desnervação do músculo esquelético sobre a homeostasia glicêmica.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Secreção de insulina**

A secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreática é um processo complexo que envolve eventos intracelulares não totalmente conhecidos (CARPINELLI et al., 1996).

O estímulo fisiológico mais importante para a secreção de insulina é a concentração de glicose circulante. A modulação de secreção de insulina desempenha papel central na manutenção das concentrações de glicose, sob condições fisiológicas. O controle da secreção de insulina em diferentes situações é resultado da interação substrato/hormônio, que atinge as ilhotas pela circulação e das influências neurais através de fibras nervosas autonômicas que nelas terminam (HOELZER et al., 1986; SHILO et al., 1990; FADDA et al., 1990). Entre os produtos do metabolismo da glicose nas células  $\beta$ , a razão ATP/ADP é o fator mais importante para ativar a secreção de insulina (TARASOV et al., 2004). O ATP liga ao canal de potássio (canal de  $K^+$ -ATP) e provoca a despolarização da membrana das células  $\beta$  (ASHCROFT et al., 1984, STRAUB & SHARP, 2002; TARASOV et al., 2004). Esta despolarização induz à abertura do canal de cálcio voltagem-sensível, aumentando a captação e a concentração

de cálcio intracelular (DEVIS et al., 1994; GRODSKY & BENNETT, 1966; HELLMAN et al., 1971). A concentração citosólica aumentada do íon cálcio ativa a subsequente extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial. O canal de  $K^+$ -ATP-dependente exerce papel fundamental em manter o potencial de repouso da célula  $\beta$ . Na Célula Beta pancreática, além da glicose, outros secretagogos como gliceraldeído, leucina, metabólitos intermediários do ciclo de Krebs, entre outras substâncias, estimulam a secreção da insulina (BOSCHERO & MALAISSE, 1979; ASHCROFT, 1980; ASHCROFT, 1988).

O processo de secreção da insulina por modulação colinérgica, envolve a hidrólise da fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) com conseqüente formação de inositol-trifosfato ( $IP_3$ ) e de diacilglicerol (DAG) (BEST & MALAISSE, 1983; MATHIAS et al., 1993). O  $IP_3$  provoca extrusão do cálcio do retículo endoplasmático e DAG ativa a proteína quinase C, a qual provoca a abertura do canal de cálcio voltagem-sensível (DUTTAROY et al., 2004). Desse modo, ambos mecanismos descritos acima, aumentam potencialmente a concentração iônica de cálcio intracelular. No entanto, vários outros mecanismos desempenham papéis no processo de secreção de insulina induzida pela glicose (GEMBAL et al., 1992), tais como o sistema de ativação calmodulina e AMP (VALVERDE et al., 1979; CARPINELLI & MALAISSE, 1980).

Nossos hábitos e comportamento têm efeito modulador no processo de secreção de insulina, justificando, assim que neurotransmissores e hormônios também controlem a secreção de insulina. Fatores neurais estão envolvidos na regulação imediata ou direta da secreção da insulina (CARPINELLI et al., 1996). As catecolaminas e a acetilcolina desempenham importante papel modulatório na secreção fisiológica de insulina pelas ilhotas pancreáticas (MATHIAS et al., 1985). Agentes

colinérgicos ativam a fosfolipase C, provocando hidrólise do PIP<sub>2</sub>, formando IP<sub>3</sub> nas ilhotas pancreáticas (BEST & MALAISSE, 1983; 1984). Por tal mecanismo, estes agentes estimulam a secreção de insulina e potencializam a resposta à glicose. O efeito inibitório da epinefrina sobre a secreção de insulina é bem conhecido (MALAISSE et al., 1967; WRIGHT & MALAISSE, 1968; LOUBATIERES et al., 1970), e ocorre durante condições de estresse e exercício físico (BRISSON et al., 1971; ZAWALICH et al., 1979), entre outras. As Catecolaminas inibem a abertura do canal de cálcio da membrana plasmática durante o processo de secreção de insulina induzida pela glicose, diminuindo as concentrações iônicas do cálcio intracelular (TAMAGAWA & HENQUIN, 1983; MATHIAS et al., 1993). Outros neurotransmissores como a dopa e dopamina também interferem no processo de secreção de insulina (STE MARIE & PALMITER, 2003; AHREN & LUNDQUIST, 1985).

## **2.2 Ação Periférica da insulina**

O reconhecimento de um hormônio normalmente ocorre via receptor que pode se localizar na membrana plasmática, no citoplasma ou núcleo. Os receptores são moléculas protéicas grandes, podendo, em alguns locais, como na membrana, conter carboidratos e radicais fosfolipídicos. Um dado hormônio pode agir por meio de diferentes moléculas receptoras em células-alvo distintas, inclusive na própria célula secretora (WHITE & KAHN, 1989).

O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica constituída de quatro cadeias protéicas, duas subunidades  $\alpha$  (135 Kd cada) e duas subunidades  $\beta$  (cada uma de 95 Kd). As cadeias  $\alpha$  parecem ser inteiramente extracelulares e contêm sítios de ligação para a insulina. As subunidades  $\beta$  são transmembranais e encontram-se

envolvidas na sinalização intracelular (KASUCA et al., 1982; ZICK, 1989; WHITE & KAHN, 1989). As quatro cadeias são interligadas por pontes dissulfeto (S-S) e contêm grupos de carboidratos na fase externa da célula. Após o acoplamento da insulina à cadeia  $\alpha$  do receptor, ocorre a ativação da cadeia  $\beta$ , que passa a apresentar atividade tirosina-quinase. O receptor se auto-fosforila, introduzindo um grupo fosfato em uma tirosina na extremidade carboxil-terminal da cadeia  $\beta$ . Esta fosforilação do receptor ocasiona a fosforilação de outras proteínas intracelulares, gerando reações em cascata que iniciam as diversas ações da insulina (CHENG et al., 2002; WHITE & KAHN, 1989). Os receptores de insulina são afetados por inúmeros agentes biológicos, incluindo níveis circulantes de insulina e outros hormônios, concentrações iônicas e de metabólitos (PESSIN et al., 1983). A insulina tem um papel fundamental na regulação da secreção da insulina através da participação autócrina e parácrina do hormônio insulínico (ARAÚJO et al., 2002).

O resultado final da ação da insulina sobre o metabolismo culmina em processos anabólicos, como também a síntese de glicogênio, de lipídios e proteínas; até ações anti-catabólicas, inibindo a glicogenólise, a gliconeogênese, a cetogênese, a lipólise, a proteólise e a saída de aminoácidos da célula (MAKINO et al., 1994). Sabe-se ainda que a insulina exerce função importante nos mecanismos de captação e transporte de muitos substratos. Entre estes, a glicose é a que possui o mecanismo mais bem estudado. A ação metabólica da insulina se inicia com a ligação do hormônio ao seu receptor, fosforilação dos substratos do receptor da insulina (IRSs), e subsequente ligação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) pelo IRSs (WHITE & KAHN, 1989).

Estas reações promovem a translocação de vesículas que contêm transportadores de glicose (GLUTs), alojadas junto ao retículo endoplasmático, em

direção a membrana plasmática. Em seguida, procede-se a exocitose destes para a membrana e, subseqüentemente, ocorre o processo de captação de glicose (SALTIEL & KAHN, 2001).

No tecido muscular, são encontradas duas isoformas de transportadores denominados GLUT 1 e GLUT 4. Neste tecido, o número de transportadores parece diferir quanto ao tipo de fibra, sendo encontrados em maior quantidade nas fibras vermelhas (metabolismo oxidativo) e em menor quantidade nas fibras brancas (metabolismo anaeróbio). Em outras células sensíveis à insulina, como nos hepatócitos, expressam-se as isoformas GLUT 1 e GLUT 2, e no tecido adiposo assim como no tecido muscular, as isoformas GLUT 1 e GLUT 4 (PESSIN & BELL, 1992; GASTER, et al., 2000).

### **2.3 Desnervação muscular, exercício e insulina**

A dinâmica contrátil da musculatura esquelética decorre da atividade de fibras nervosas motoras que ao se interiorizarem no músculo, perdem sua bainha de mielina e ramificam-se (em ramos terminais), entrando em contato com a membrana da fibra muscular esquelética através de placas motoras. O aparato contrátil, para um perfeito funcionamento, necessita que suas estruturas estejam íntegras. A perda desta integridade por qualquer estímulo que promova alterações denominadas, lesões musculares, torna o funcionamento deste aparato deficitário (HOFMANN, 1987).

O suprimento energético do músculo esquelético decorre da utilização da glicose e dos ácidos graxos como substratos preferenciais. No caso da glicose se faz através de isoformas de transportadores sensíveis ou não à insulina cuja função é transportar a glicose do espaço extra-celular para o citosol. A regulação do processo de

captação de glicose ocorre de maneira multifatorial dependendo da presença da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda da atividade contrátil das fibras (KLIP & PAQUET, 1990).

Com o advento da biologia molecular tem-se demonstrado a existência de inúmeras famílias de transportadores de glicose (GLUT), numeradas segundo a ordem cronológica de publicação do sequenciamento do DNA. No tecido muscular predominantemente encontramos o GLUT4, que na condição de repouso se encontra inserido em um sistema vesicular interno na célula, não contribuindo para a captação de glicose. Na presença de insulina, observa-se um rápido e reversível aumento na atividade transportadora de glicose, resultante primeiramente da translocação de GLUT 4 do “pool” latente para a membrana plasmática (BURANT et al, 1991).

O sequenciamento do DNA, que codifica a replicação do transportador de glicose insulina sensível GLUT 4, mostrou 96% de identidade entre as seqüências observadas no homem, rato e camundongo. Esta hegemonia mostra que resultados experimentais observados em ratos são plausíveis de se observar também em humanos (BURANT et al, 1991).

No músculo, a insulina promove a translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana, elevando a captação de glicose que pode ser oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato, ou direcionada para formação de glicogênio que é composto de 70 a 85 % da glicose captada em repouso (KELEY et al., 1990). Por outro lado, tem-se sugerido a existência de uma população de GLUT 4 insensível à insulina, que é translocada devido a mudanças no perfil contrátil das fibras musculares (HENRIKSEN et al., 1991; SUAREZ et al., 2001).

O conteúdo de glicogênio nos músculos está relacionado diretamente a capacidade aeróbia ou à capacidade de endurance do organismo, de forma que as alterações no perfil enzimático, das mitocôndrias e das reservas glicogênicas são os responsáveis pela eficiência do trabalho muscular (TAYLOR, 1991).

KLIP & PAQUET (1990), propuseram que a captação de glicose estimulada pela elevação no padrão contrátil varia, dependendo de fatores como, por exemplo, a espécie estudada, o tipo de fibra muscular ou o padrão metabólico vigente da fibra. Neste contexto, músculos de humanos que são mais sensíveis à insulina responderiam de forma diferenciada dos músculos de ratos (ANDERSEN et al., 1993; SARABIA et al.1992).

A diferença na capacidade de transportar glicose entre os tipos de fibras musculares, tem sido atribuída ao maior número de GLUT 4 presente na musculatura vermelha, quando comparada à musculatura branca (GOODYEAR et al., 1991; PLOUG et al., 1987; RICHARDSON et al., 1991). As variações na distribuição da população de GLUT 4 na membrana da célula muscular esquelética, está relacionada diretamente à demanda metabólica em decorrência da atividade neuromuscular (GOULD & BELL, 1990).

O músculo esquelético de rato possui 3 tipos distintos de fibras que exibem diferentes sensibilidade e responsividade a insulina, a saber: tipo I caracterizado por fibras lentas vermelhas; tipo IIa caracterizado por fibras vermelhas rápidas e tipo IIb caracterizado por fibras brancas rápidas. Em condição de repouso a captação de glicose estimulada pela insulina é maior nas fibras tipo I e IIa, que expressam um maior número de transportadores de glicose que as fibras brancas (ARMSTRONG & PHELPS, 1984; MCDERMOTT et al, 1991; JAMES et al, 1985).

Diversos estudiosos avaliaram as interações entre a inervação e a homeostasia energética do tecido muscular; neste aspecto, estudos da integração entre o nervo frênico e o diafragma, “*in vivo*” e “*in vitro*”, mostraram que após a secção do nervo, a captação de glicose estimulada pela insulina foi reduzida, comprometendo o metabolismo glicídico deste tecido (SMITH & LAWRENCE, 1984). Os estudos das adaptações metabólicas das fibras musculares na atividade física mostraram a existência de uma população de GLUT4, externalizada dos reservatórios citosólicos para a membrana plasmática, devido à mudança no status metabólico da fibra, não dependendo da ação da insulina, o que torna claro alguns tratamentos fisioterápicos, uma vez que influenciam na manutenção da homeostasia energética das fibras (JARVINEN et al., 2005).

O músculo desnervado é diferente do músculo normal. Clinicamente, as conseqüências mais óbvias de uma interrupção completa de inervação motora são: (1) a perda imediata da atividade voluntária e reflexa do músculo, seguida de (2) uma atrofia muscular progressiva durante semanas ou meses seguintes. Essas seqüelas clínicas, no entanto, representam somente uma parcela das respostas, uma vez que as fibras do músculo desnervado são bioquímica, mecânica, elétrica e morfologicamente diferentes das fibras do músculo normal (MAGNUSSON et al., 2005). Diversos estudos dos efeitos da desnervação sobre a homeostasia energética do músculo sóleo têm demonstrado redução na sensibilidade à insulina; redução na atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose (LIN et al., 2002), redução na captação de glicose, redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 e GLUT 4 (CODERRE et al., 1992) e redução no metabolismo muscular da glicose, fatores que podem desencadear o processo de hipotrofia (HENRIKSEN et al., 1991;

MAGNUSSON et al., 2005). Concomitante a desnervação da musculatura esquelética observa-se redução na ação da insulina, fato altamente expressivo a partir do terceiro dia pós - desnervação quando se observa redução de 80% nesta sensibilidade (SMITH & LAWRENCE, 1984).

Por outro lado, constatou-se que o aumento na atividade contrátil induzida pelo exercício físico favorece a captação de glicose pelas fibras musculares (DOUEN et al., 1990). Isto é explicado pela translocação dos transportadores GLUT4 insensíveis à insulina dos reservatórios citosólicos para a membrana aumentando com isso a captação da glicose (GOODYEAR et al., 1992; NEUFER, et al., 1992; RODNICK et al., 1992). Convém salientar que, a associação da insulina com a atividade contrátil, promove um aumento adicional no número de transportadores de glicose, efeito mais pronunciado nos músculos ricos em fibras oxidativas do que nos músculos compostos apenas de fibras glicolíticas (MEGENEY et al., 1992; NESHER et al., 1985; PLOUG et al., 1987; WALLBERG - HENRIKSSON, 1987; HENRIKSEN et al., 1990; KERN et al., 1990). Isto sustenta a hipótese de que diferentes mecanismos comandam a estimulação de transportadores de glicose pelo exercício e pela insulina. Realmente, existem evidências de que há dois espaços intracelulares distintos ou “poças” de transportadores de glicose no músculo esquelético, um responde ao exercício e outro à insulina (GOODEYAR & KAHN, 1998; FRANCH et al., 1999). A contração muscular aumenta o transporte de glicose e o metabolismo por um mecanismo independente da insulina (IHLEMANN et al., 1999; RYDER et al., 1999).

O exercício em humanos resulta em numerosas adaptações benéficas no músculo esquelético, incluindo o aumento na expressão do GLUT 4. O exercício também induz melhora na sensibilidade do músculo para a insulina. Isto é um fenômeno

local restrito aos músculos exercitados. Esses efeitos podem durar por várias horas após o final do exercício (GOODYEAR & KAHN, 1998).

Como a contração e a insulina estimulam o transporte de glicose por mecanismos distintos, a via de sinalização para contração que estimula o transporte de glicose e síntese de glicogênio tem provocado grande interesse porque a contração muscular pode estimular o transporte de glicose e a translocação de GLUT 4 igualmente nos músculos resistentes à insulina (FRANCH et al., 1999).

### 3. OBJETIVO

*O presente estudo teve por objetivo analisar possíveis alterações no metabolismo glicídico muscular decorrente da imobilização e sua implicação na homeostase glicêmica. Visou ainda avaliar os efeitos do treinamento físico sobre tais alterações.*

Para atingir esse objetivo, foram realizados 3 estudos.

- O primeiro, intitulado “Metabolismo da glicose em ratos submetidos a desnervação do músculo esquelético” teve por objetivo analisar os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação do músculo esquelético sobre o metabolismo da glicose em ratos sedentários. Aceito para publicação no periódico; *Brazilian Archives of Biology and Technology* – ISSN – 1516-8913.
- O segundo, intitulado “Metabolismo glicídico em ratos submetidos à desnervação do músculo esquelético e ao exercício de natação” visou analisar o metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos submetidos à desnervação bem como a resposta do animal à insulina exógena e ao exercício. Aceito para publicação no periódico; *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* – ISSN - 1517-8692.

- O terceiro, intitulado “Efeito da desnervação do músculo esquelético sobre a secreção de insulina e o metabolismo da glicose em ratos” tendo como objetivo analisar o metabolismo da glicose e a secreção da insulina de ratos desnervado. Será submetido à Revista a ser definida.

#### 4. CAPÍTULO I

##### METABOLISMO GLICÍDICO EM RATOS SUBMETIDOS A DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Wilton Marlindo Santana Nunes, Maria Alice Rostom de Mello.

Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista UNESP - Rio Claro, SP, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology (APÊNDICE 1)**

#### 4.1 RESUMO

Este estudo analisou os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por deservação do músculo esquelético sobre o metabolismo glicídico. Em ratos submetidos à secção do nervo ciático da pata direita observou-se redução da captação de glicose pelo músculo sóleo isolado da pata desnervada após 3 e 7 mas não após 28 dias em relação a animais controle. Não houve diferença após 3 e 7 dias na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral intacta em relação ao animal controle. Houve aumento da captação de glicose nesta mesma pata 28 dias após a deservação. A taxa de remoção da glicose em resposta à insulina exógena após 28 dias de deservação foi significativamente superior à dos animais controle e àquelas observadas após 3 e 7 dias da deservação. Esses resultados sugerem que a imobilização por deservação

interfere não só no metabolismo da glicose no músculo esquelético envolvido como também em outros tecidos.

**Palavras chaves:** Desnervação, Metabolismo da glicose, Músculo esquelético.

#### 4.2 ABSTRACT

This study analyzed the local and systemic effects of immobilization by denervation of the skeletal muscle on glucose metabolism. The rats were submitted to section of the right paw sciatic nerve, a reduction was observed in glucose uptake by the isolated soleus muscle of the denervated paw after 3 and 7 days, but not after 28 days in relation to the control animals. There was no difference after 3 and 7 days in glucose uptake by the soleus muscle of the opposite intact paw in relation to the control animals. There was increased glucose uptake in this same paw 28 days after denervation. The rate of glucose removal in response to exogenous insulin after 28 days of denervation was significantly higher than in control animals and those observed after 3 and 7 days of denervation. These results suggest that immobilization by denervation interferes not only in glucose metabolism in the skeletal muscle involved but also in other tissues.

**Key Words:** Denervation, Glucose metabolism, Skeletal muscle

### 4.3 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a glicose é um importante substrato energético para o organismo e por isso, tem-se estudado exaustivamente o seu comportamento em varias situações fisiológicas e patológicas. A resistência periférica à insulina caracteriza-se principalmente pela diminuição da captação da glicose pela musculatura esquelética (DOHERTY et al., 1997). A diminuição da captação da glicose acha-se associado a falhas tanto no mecanismo de acoplamento do hormônio ao seu receptor específico, quanto nos eventos pós-receptor (SAAD, 1994).

Desde sua descoberta em 1921, muitos esforços têm sido dedicados ao entendimento dos mecanismos de ação da insulina. Na busca da compreensão dos processos que levam à resistência à insulina, vários modelos foram propostos nas últimas décadas, dentre estes, a desnervação do músculo esquelético. O exato mecanismo molecular de sinalização intracelular, que é mediado pelo receptor da insulina e que resulta em diversas respostas biológicas, foi apenas parcialmente elucidado nesse modelo de desnervação (BERTELLI et al., 2003). A interrupção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina. Isso foi mostrado primeiramente por Buse e Buse em 1959. Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura

desnervada, sendo o músculo da pata do rato controle utilizado como controle (HOFMANN, 1987; DAY et al., 2001; PAASSEN et al., 2002; BERTELLI et al., 2003).

Sabe-se que a imobilização do tecido muscular por desnervação causa inúmeras alterações locais, onde a captação de glicose e a síntese do glicogênio são diminuídas (SMITH et al., 1988; LIN et al., 2002), assim como a sensibilidade à insulina (SOWELL et al., 1989). Ocorre redução da atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose e da expressão gênica dos transportadores de glicose (ELMERNDORF et al., 1997), associada ao processo de atrofia (CODERRE et al., 1992; HENRIKSEN et al., 1991).

Na musculatura esquelética, o transporte de glicose é mediado pela proteína transportadora de glicose GLUT-4. A insulina aumenta o transporte de glicose pela translocação de moléculas GLUT-4 proveniente de depósitos intracelulares para a membrana plasmática (GUMÁ et al., 1995). Segundo Turinsky (1987), o efeito da desnervação no metabolismo muscular é influenciado pela população de fibras musculares e o fenômeno da desordem metabólica provocada pela desnervação inicia-se entre 3 a 6 horas após a secção do nervo. Por outro lado, poucos estudos abordam os efeitos das alterações musculares decorrentes da imobilização por desnervação sobre a manutenção da homeostase glicêmica pelo organismo como um todo.

Os tecidos muscular e adiposo são os dois principais sítios de ação hipoglicemiante da insulina e compõem juntos quase 65% do peso corporal (GUYTON & HALL, 2002). Dessa forma qualquer alteração na sensibilidade e/ou responsividade desses tecidos ao hormônio pode causar comprometimento da homeostase glicêmica. Assim sendo, o presente estudo visou analisar os efeitos locais e sistêmicos da

imobilização por desnervação do músculo esquelético no metabolismo glicídico de ratos, no intuito de verificar a aplicabilidade do modelo em estudos voltados a análise da homeostase glicêmica em condição de imobilização parcial.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 3 a 5 meses fornecidos pelo Biotério da UNESP. Os animais tiveram livre acesso ao alimento e ração (Purina para roedores) e à água “*ad libitum*” sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h. à temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C. Os animais foram tratados de acordo com o Guide for care use of laboratory animals (National Research Council, 1996).

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico, (Thiopental, ABBOTT, SP), na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal e tricotomizados na porção posterior das coxas por onde uma porção do nervo ciático da pata direita foi seccionada e retirada, segundo o modelo de desnervação proposto por Coderre et al, 1992. Foram formados 4 grupos; Controle: animal intacto; Desnervado 3 dias: analisado 3 dias após a desnervação; Desnervado 7 dias: analisado 7 dias após a desnervação; Desnervado 28 dias: analisado 28 dias após desnervação. Numa primeira série de experimentos, o metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado foi verificado após sacrifício dos animais por decapitação. O músculo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25 – 35 mg foram primeiro incubadas por 30 min a  $37^\circ$  C em banho Maria de Dubinoff (FANEN, MODELO 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%; HEPES 6,64 mM; KCl 0,032% CaCl<sub>2</sub> 1,14 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,015%; NaHCO<sub>3</sub> 0,19%; MgSO<sub>4</sub> 0,03%) equilibrado com a mistura de 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>, pH 7,4. Após este período, as fatias musculares foram transferidas para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [U<sup>14</sup>C] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2DG, 0,5 µCi/mL) e insulina (100 µM/mL). Dentro do frasco externo, foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700µL de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nessa última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa de plástico, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema, contendo as fatias de músculo, foi incubado em banho Maria de Dubinoff por 60 min. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO<sub>2</sub> foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e o CO<sub>2</sub> foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37°C. A incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no precipitado obtido durante o processo de extração do glicogênio muscular (SJORGREEN et al., 1938). A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radiatividade do <sup>14</sup>C no líquido contido no frasco interno. A captação da glicose (2DG) foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do <sup>3</sup>H+. Toda a medição da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno. Em série separada de experimentos, usando ratos na mesma condição da série anterior, a resposta à insulina

exógena foi avaliada através do teste de tolerância à insulina intravenosa (ittiv). Em outra série de experimentos, animais de todos os grupos receberam insulina (mista regular purificada), injetada na veia peniana na concentração de 1UI/mL na dose de 1UI/Kg de peso corporal. Amostras de sangue (100 µl) foram coletadas a partir da veia femoral em seringas de 1 mL antes (tempo 0) e após 2:30, 5:00, 10:00, e 20:00 (min:s) da administração da insulina, para determinação da glicose sérica. A taxa de remoção de glicose (Kitt), durante o teste de tolerância à insulina, foi calculada de acordo com LUNDBAEK (1962), utilizando-se o programa de computador ORIGIN<sup>®</sup> 6.0. Amostras do tecido hepático foram coletadas para dosagem do glicogênio (LO et al., 1970). A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey, onde apropriado. Em todos os casos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 RESULTADOS

Na primeira série de experimentos, observou-se redução significativa da captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 7 dias, em relação ao grupo controle (figura 1). Por outro lado, não houve diferenças significativas na pata desnervada após 3 e 28 dias em relação ao grupo controle. A captação de glicose foi também avaliada no músculo sóleo da pata contralateral dos grupos controle e desnervado após 3, 7 e 28 dias. Os resultados mostraram que não houve alteração na pata contralateral intacta dos animais desnervados após 3 e 7 dias. Em contrapartida, verificou-se aumento significativo na captação da glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral do animal desnervado após 28 dias em relação ao animal controle (figura 1).

Foram ainda analisadas a oxidação da glicose e a síntese de glicogênio pelo músculo sóleo isolado. Não houve diferença na oxidação da glicose, entre as patas desnervada dos animais após 3 e 28 dias e nem tão pouco no sóleo contralateral dos animais desnervados após 3, 7 e 28 dias em relação ao animal controle. Por outro lado, a oxidação da glicose diminuiu na pata desnervada após 7 dias (figura 2). Com relação à síntese de glicogênio, houve diminuição nas patas desnervada e contralateral dos animais após 3 e 7 dias e aumento nas patas desnervadas e contralateral dos animais após 28 dias em relação ao rato controle (figura 3).

Na segunda série de experimentos, avaliamos a taxa de remoção da glicose sangüínea (Kitt) em ratos submetidos a um teste de tolerância à insulina endovenosa (ivitt). Os resultados obtidos se encontram na figura 5. Os valores de Kitt dos animais após 28 dias de desnervação foram significativamente maiores do que os dos animais controle e daqueles após 3 e 7 dias de desnervação (figura 5).

O tecido hepático tem importância excepcional no metabolismo da glicose, e por esta razão, verificamos os teores hepáticos de glicogênio após o teste de tolerância à insulina endovenosa, visando avaliar os efeitos da insulina exógena. Os resultados mostraram um aumento nos estoques de glicogênio dos animais desnervados após 3 e 7 dias em relação aos animais controle. No entanto, não houve alteração nos estoques de glicogênio dos animais após 28 dias de desnervação (figura 4).

#### 4.6 DISCUSSÃO

Neste estudo, verificamos que a captação de glicose pelo músculo sóleo, induzida pelo hormônio insulina sofreu variação entre grupos. Animais após 7 dias de desnervação, tiveram a captação de glicose diminuída pelo músculo sóleo da pata desnervada. Em contrapartida, a pata contralateral permaneceu com valores próximos aos da pata do animal controle (figura 1). Esta diminuição da captação da glicose pelo músculo após 7 dias de desnervação, está relatada na literatura. Estudos demonstraram diminuição da captação de glicose na musculatura esquelética de ratos desnervado após 3 dias e 7 dias (TURINSKY, 1987, HIROSE et al., 2001; TURINSKY & DAMRAU-ABNEY, 1998). O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição na captação de glicose em músculos desnervados por 3 e 7 dias está relacionado, em parte, à alteração dos mecanismos internos da cascata de reações químico-enzimáticas que culminam na translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (BERTELLI et al., 2003 e HIROSE et al., 2001). Não houve alteração na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 28 dias. Por outro lado, a captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral desse mesmo grupo foi significativamente maior do que a pata do controle intacta. Davis & Karl (1988), verificaram em ratos que o transporte de glicose no músculo esquelético desnervado na presença de insulina reduzia-se entre o 3º e 7º dia de desnervação, aumentava após 7 dias e aumentava ainda

mais ao 10º dia de desnervação. A redução no transporte da glicose em resposta à insulina entre o 3º e o 7º dia de desnervação sugere resistência à insulina no músculo esquelético desnervado, com um retorno da resposta normal à insulina a partir do 10º dia desnervado (DAVIS & KARL, 1988).

A Desnervação inibe múltiplos aspectos do metabolismo da glicose na musculatura esquelética, além da captação, entre eles a interrupção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina. Isso foi mostrado primeiramente por Buse e Buse em (1959). Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura desnervada (HOFMANN, 1987; DAY et al., 2001; PAASSEN et al., 2002; BERTELLI et al., 2003).

A incorporação da glicose em glicogênio o conteúdo da glicose-6-fosfato e a atividade da enzima glicogênio sintase, são etapas que tem um papel fundamental no metabolismo da glicose no tecido muscular (BURANT et al., 1984). A Mudança dessas etapas tem sido atribuída às perdas do fator trófico derivado do nervo e/ou da estimulação elétrica pelo nervo (DAVIS & KARL, 1988). Por outro lado, o aumento dos receptores de neuroregulina na junção da placa motora favorece o aumento da expressão e modulação dos transportadores de glicose já que a desnervação não tem nenhum efeito sobre a expressão gênica desta proteína (SUAREZ et al., 2001).

A oxidação da glicose sofreu uma diminuição na pata do animal desnervado após 7 dias (figura 02). Este dado sugere comprometimento da utilização da via glicolítica pela glicose. Parece haver recuperação da utilização desta via no músculo sóleo de animais desnervados após 10 dias (DAVIS & KARL, 1988). Esta última

informação foi confirmada no presente estudo, pois após 28 dias de desnervação, os valores referentes à oxidação da glicose no músculo sóleo foram normalizados.

A hipotrofia muscular geralmente é evidente após o 3º dia de desnervação e consideravelmente maior ao 7º dia de desnervação. Segundo Wallis et al. (1999), a diminuição da atividade do glicogênio sintase e aumento da fosforilase no músculo desnervado é um dos responsáveis pela atrofia. Esta atrofia ocorre em menor ou maior grau dependendo do tipo de fibra muscular em questão. Nossos dados referentes à síntese de glicogênio mostram que houve diminuição neste parâmetro tanto na pata desnervada quanto na contralateral 3 e 7 dias após a desnervação. Por outro lado, a síntese de glicogênio após 28 dias aumentou em relação ao controle.

Em resumo, nossos resultados referentes ao metabolismo da glicose no músculo esquelético desnervado, confirmam e ampliam informações já descritas na literatura.

Uma vez constatada a adequação do modelo, passamos a analisar o efeito da desnervação da musculatura esquelética sobre a homeostase glicêmica do animal. Para isso, avaliamos a taxa de remoção da glicose sangüínea (Kitt) bem como os teores hepáticos de glicose após administração “*in vivo*” de insulina exógena.

Nossos resultados mostraram alteração no estoque de glicogênio no tecido hepático dos ratos submetidos a desnervação em relação aos controles após administração de insulina exógena. O aumento significativo do conteúdo de glicogênio hepático de ratos após 3 e 7 dias de desnervação em relação aos controles, sugere aumento na sensibilidade hepática ao hormônio nos ratos submetidos a desnervação. Este fenômeno parece relacionado à duração da desnervação.

A taxa de remoção da glicose sangüínea após administração da insulina exógena foi significativamente maior nos ratos após 28 dias de desnervação em relação aos controles e aos valores observados após 3 e 7 dias de desnervação. O comportamento da glicose circulante observado durante o teste de tolerância à insulina parece refletir adaptações a longo prazo do organismo como um todo à imobilização parcial imposta pela desnervação do músculo esquelético. Após 3 e 7 dias de desnervação, a taxa de remoção da glicose sangüínea em resposta à insulina exógena não se altera em comparação ao animal controle. Isto pode ser devido, pelo menos em parte, ao aumento da sensibilidade à insulina pelo tecido hepático. Por outro lado, após 28 dias de desnervação, o aumento observado na taxa de remoção da glicose sangüínea em resposta à insulina, provavelmente relaciona-se ao aumento da sensibilidade ao hormônio na musculatura íntegra, conforme sugerem os resultados da captação de glicose pelo músculo sóleo isolado da pata contralateral dos ratos submetidos a desnervação. Estas alterações precisam ser mais investigadas.

#### **4.7 CONCLUSÃO**

Concluindo, o conjunto dos resultados do presente estudo é indicativo de que a desnervação do músculo esquelético não somente provoca alterações metabólicas locais como pode interferir no metabolismo da glicose pelo organismo como um todo. Desta forma, ratos submetidos à imobilização parcial por desnervação do músculo esquelético podem constituir um modelo útil ao estudo da homeostase glicêmica sob condição de imobilização.

#### **4.8 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio pela assistência técnica e as fundações Brasileiras de suporte financeiro a pesquisa: FAPESP, CNPq e Capes.

#### 4.9 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

BERTELLI, D.F.; UENO, M.; AMARAL, M.E.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; CARVALHO, C.R.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A. C., Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism**, Bethesda, v.284(4):E679-87, 2003.

BURANT, C.F.; LEMMON S.K.; TREUTELAAR, M.K.; BUSE, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.247(5 Pt 1):E657-66, 1984.

BUSE, M.G.; BUSE, J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. **Diabetes**. Alexandria, May-Jun;8(3):218-25, 1959.

---

<sup>1</sup> De acordo com:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – NBR 6023/2002

CODERRE, L.; MONFAR, M.M.; CHEN, K.S.; HEYDRICK, S.J.; KUROWSKI, T.G.; RUDERMAN, N.B. & PICH, P.F. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. **Endocrinology**. Bethesda, v.131 (4): 1821-1825, 1992.

DAVIS, T. A. & KARL, I. E. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in desnervated muscle. **Journal Biochemistry**. 254, 667-675, 1988.

DAY, C.S.; RIANO, F.; TOMAINO, M.N.; BURANATANITKIT, B.; SOMOGYI, G.; SOTEREANOS, D. AND HUARD, J. Growth factor may decrease muscle atrophy secondary to denervation. **J. Reconstr. Microsurg.**, 1: 51-57, 2001.

DOHERTY,R.O.;STEIN, D.;FOLEY, J. Insulin resistance. **Diabetologia**. New York 40:B10 – B15, 1997.

ELMERNDORF, J.S.; DAMRAU-ABNEY, A.; SMITH, T.R.; DAVID, T.S.; TURINSKY, J. Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal of Physiology**. Bethesda Apr; 272(4 Pt 1):E661-70, 1997.

GUMÁ, A.; ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON AND KLIP, A. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism**, Bethesda, v.268, pE613 – E622, 1995.

GUYTON, A. C., HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2002.

HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J.; MONDON, C.E.; JAMES , D.E.;HOLLOSZY, J.O. Effect of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. **Journal. Applied. Physiology**, Bethesda, v.70(5):2322-2327, 1991.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.;YASUHARA, S.; IBEBUNJO, C.; MARTYN, J.A.; IEBUNJO, C. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. **Metabolism**, Rome, Feb;50(2):216-22, 2001.

HOFMANN, W.W. Musculotrophic effects of insulin receptors before and after denervation. **Brain Research**. Jan 20; 401(2):p312-321, 1987.

LIN,Y.;BRADY,M.J.;WOLANSKE,K.;HOLBERT,R.;RUDERMAN,N.B.;YANEY,G. C. Alterations of nPKC distribution, but not Akt/PKB activation in denervation rat soleus muscle. **American. Journal of. Physiology Endocrinology Metabolism**, Bethesda, Aug, v. 283(2) pE318 – E325, 2002.

LO, S.; RUSSELL, J.C. ;TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal Applied Physiology**. Feb; v. 28(2):234-6, 1970.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J.** Jun 2; 5291: p1507-13, 1962.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory. National Academy Press, Washington, DC, USA.

PAASSEN-IJKEMA, J.; MEEK, M.F. AND GRAMSBERGEN, A. Reinnervation of muscle after transection of sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*, v. 6: p891 – 897, 2002.

SAAD, M. J. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto v.27(4): p941 – 957, 1994.

SJORGREEM, B.; NORDENSKJOLD, D.T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Beitrag zur Kenntnis des le berrhythmik. *Pfluger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere*, 240;247, 1938.

SMITH, R.L.; RACH,P.J.; LAWRENCE, J.C.(1988),Insulin resistance in denervated skeletal muscle. **Journal Biological Chemistry**, 263: p658 – 665, 1988.

SOWELL, M. O.; DUTTON, S.L.; BUSE, M.G. Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bethesda, 257:E418 –E425, 1989.

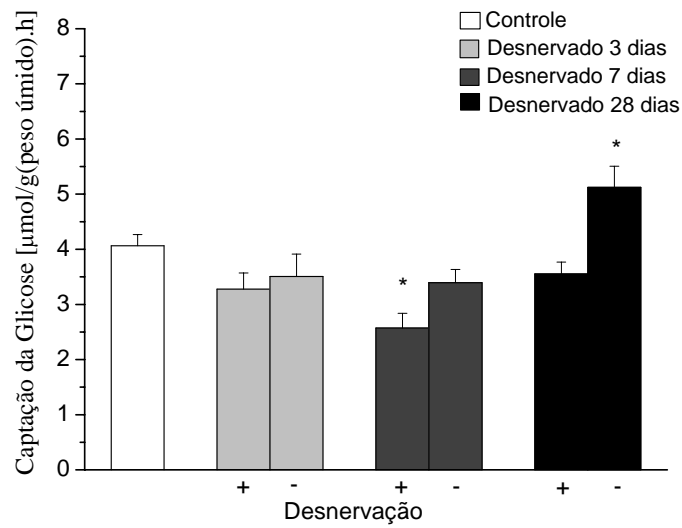
SUAREZ E, BACH D, CADEFAU J, PALACIN M, ZORZANO A, GUMA A. A novel role of neuregulin in skeletal muscle. **J Biol Chem** 25;276(21):18257-64, 2001.

TURINSKY, J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.252 (3 Pt 2): pR531-7, 1987.

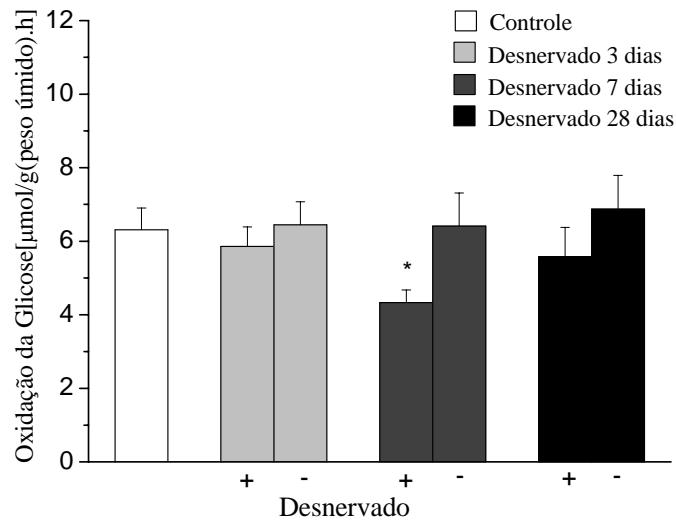
TURINSKY J. & DAMRAU-ABNEY A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.275 (5pt2): pR1425 – R1430, 1998.

WALLIS, M.G.; APPLEBY, G.J.;YOUD, J.M.;CLARK, M.G.; PENSCHOW, J.D. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated Hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. **Live Sciences**, Vol. 64, (4), p221-228, 1999.

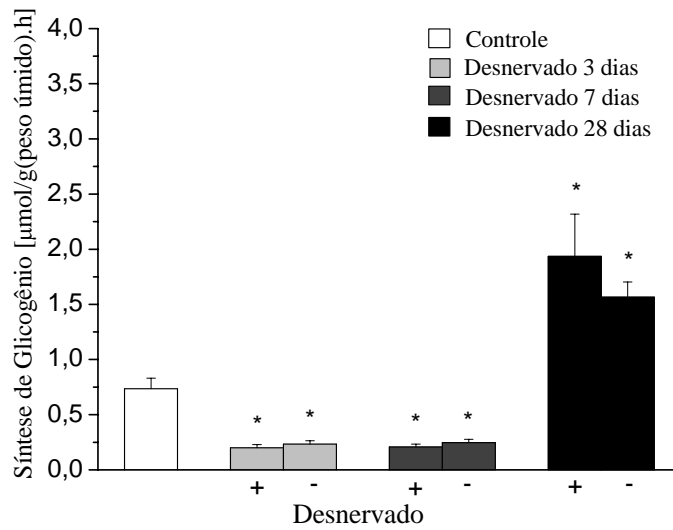
## 4.9.1 FIGURAS



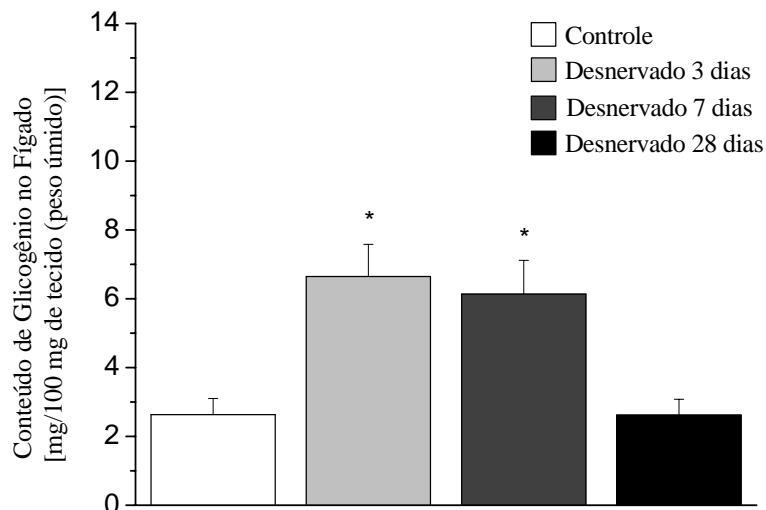
**Figura 1:** Captação de glicose pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal(-) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 7$  a 10 fatias musculares por grupo.



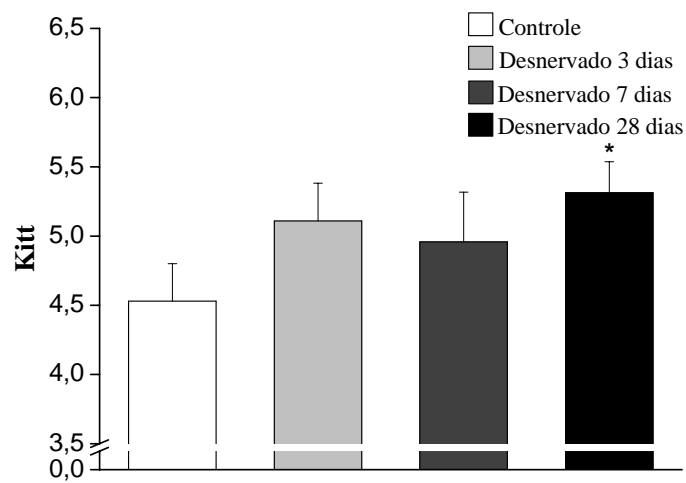
**Figura 2:** Oxidação da glicose no músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal (-) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 8$  a 10 fatias musculares.



**Figura 3:** Síntese de glicogênio pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal(-) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 10$  a 13 fatias musculares.



**Figura 4:** Teor de glicogênio hepático dos animais(média  $\pm$  erro padrão) após 60 minutos da administração da insulina regular (1UI/Kg) via intravenosa. Controle refere-se a animais íntegros. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 5$  a 10 ratos por grupo.



**Figura 5:** Taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt), durante teste de tolerância à insulina (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. Controle refere-se a animais íntegros. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 8$  a  $10$  animais por grupo.

## **5. CAPÍTULO II**

METABOLISMO GLICIDICO EM RATOS SUBMETIDOS A DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E AO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO.

Wilton Marlindo Santana Nunes, Maria Alice Rostom de Mello.

Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Rio Claro, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte (APÊNDICE II).**

### **5.1 RESUMO**

A desnervação do músculo esquelético implica em alterações do metabolismo da glicose bem conhecidas, porém pouco se sabe sobre a influência destas alterações na sensibilidade periférica à insulina do animal como um todo. O presente estudo visou analisar o metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos submetidos a desnervação bem como a resposta do animal à insulina exógena e ao exercício.

Ratos wistar de 3 a 5 meses foram submetidos a secção do nervo ciático da pata direita. Após 48 horas metade do grupo iniciou programa de natação, 1 hora/dia, 5 dias/semana. Como controle foram utilizados animais íntegros, submetidos ou não ao exercício. Decorridos 28 dias, para a avaliação da resposta à insulina, os ratos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Os resultados foram analisados através da determinação da taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt). Em outro lote de animais

fatias do músculo sóleo desnervado e da pata contralateral íntegra foram incubadas na presença de glicose (5,5mM), contendo [<sup>3</sup>H]2-deoxiglicose (0,5μCi/mL) e [U<sup>14</sup>C] glicose (0,25μCi/mL) e insulina (100μU/mL), para análise de captação, oxidação da glicose e síntese de glicogênio. Ratos desnervados submetidos ao exercício apresentaram Kitt (%/min) superior ( $7,22 \pm 0,49$ ) aos dos sedentários ( $5,31 \pm 0,22$ ), e dos controles sedentários ( $4,53 \pm 0,27$ ). A captação ( $3,55 \pm 0,21$ ) e a oxidação ( $4,06 \pm 0,33$ ) da glicose (μmol/g.h) pelo músculo desnervado, foram inferiores às do músculo contralateral nos ratos sedentários (captação:  $5,12 \pm 0,38$ , oxidação:  $5,26 \pm 0,30$ ). O exercício crônico elevou a captação e a oxidação da glicose no músculo contralateral (captação:  $6,53 \pm 0,37$  oxidação:  $20,39 \pm 1,91$ ) e no desnervado (captação:  $5,70 \pm 0,41$ , oxidação:  $20,54 \pm 1,97$ ). O mesmo aconteceu com o grupo controle exercitado. Esses resultados sugerem que alterações locais do metabolismo glicídico muscular influenciaram a resposta sistêmica à insulina do animal. Além disso, o exercício melhorou o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado.

**PALAVRAS CHAVES:** Desnervação, Exercício, Insulina e Glicose.

## 5.2 ABSTRACT

Denervation of the skeletal muscles involves well known alterations of the glucose metabolism, however, little is known about the influence of these alterations on the peripheral sensitivity to insulin of the animal as a whole. This study aimed to analyze the metabolism of glucose in the soleus muscle of rats submitted to denervation as well as the animal's response to exogenous insulin and to exercise.

Wistar rats from 3 to 5 months old were submitted to section of the sciatic nerve in the right paw. After 48 hours, half of them started a swimming program of 1 hour/day, 5 days/week. As control, whole animals were used, either submitted to exercise or not. After 28 days had elapsed, for evaluating the response to insulin, the rats were submitted to the insulin tolerance test. The results were analyzed by determining the blood glucose removal rate (KiTT). In another lot of animals, slices of the denerved soleus muscle and opposite whole paw were incubated in the presence of glucose (5.5mM), containing [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose (0.5 $\mu$ Ci/mL) and [U<sup>14</sup>C] glucose (0.25 $\mu$ Ci/mL) and insulin (100 $\mu$ U/mL), for analyzing glucose uptake, oxidation and glycogen synthesis. Denerved rats submitted to exercise presented with KiTT (%/min) higher ( $7.22 \pm 0.49$ ) than the sedentary animals ( $5.31 \pm 0.22$ ), and the sedentary control animals ( $4.53 \pm 0.27$ ). Uptake ( $3.55 \pm 0.21$ ) and oxidation ( $4.06 \pm 0.33$ ) of glucose ( $\mu$ mol/g.h) by the denerved muscle were lower than those of the opposite muscle in the

sedentary rats (uptake:  $5.12 \pm 0.38$ , oxidation:  $5.26 \pm 0.30$ ). Chronic exercise raised glucose uptake and oxidation in the opposite muscle (uptake:  $6.53 \pm 0.37$ , oxidation:  $20.39 \pm 1.91$ ) and in the denervated muscle (uptake:  $5.70 \pm 0.41$ , oxidation:  $20.54 \pm 1.97$ ). The same happened with the exercised control group. These results suggest that restricted alterations of the muscular glucose metabolism influenced the systemic response to insulin of the animal. Furthermore, exercise improved the uptake and use of glucose in the denervated muscle.

**Key Words:** Denervation, Exercise, Insulin and Glucose

### **5.3 INTRODUÇÃO**

A glicose é o principal substrato energético do organismo. Por este motivo, tem-se estudado exaustivamente o seu metabolismo em processos fisiológicos e patológicos. A resistência periférica a insulina está relacionada à diminuição do efeito normal da insulina em estimular os processos biológicos e regulatórios ao nível celular. No caso da homeostasia da glicose, resistência à insulina geralmente refere-se a diminuição do efeito da insulina em estimular o transporte da glicose e seu metabolismo na musculatura esquelética e no tecido adiposo, concomitante com aumento da produção de glicose pelo fígado (HENRIKSEM & SAENGSIKISUWAN, 2003). Estas características relatadas proporcionam conhecidamente a diminuição da sensibilidade periférica a insulina.

A diminuição da captação da glicose pelos tecidos alvo está associada à falhas tanto no mecanismo de acoplamento do hormônio ao seu receptor específico, quanto nos eventos pós-receptor (SAAD, 1994). A ação metabólica da insulina se inicia com a ligação do hormônio ao seu receptor, fosforilação dos substratos do receptor da insulina (IRSs), e subsequente ligação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) pelo IRSs (WHITE, 1989).

O desuso crônico da musculatura esquelética, produzida por inatividade devida a condições de repouso, imobilização de membros e microgravidade, induz resistência local à insulina e a um estado catabólico que afeta a musculatura esquelética

(FERRANDO et al., 1996; SHANGRAW et al, 1988; STEIN et al, 1994; STUART et al, 1988). Estudos com animais, incluindo ratos, têm confirmado que a imobilização está associada à redução da captação da glicose induzida pela insulina (BOOTH, 1982; PLOUG et al., 1995). Resistência à insulina é também o maior problema em portadores de certas patologias, que implicam em inatividade e/ou imobilização. Sabe-se que a imobilização do tecido muscular por desnervação causa inúmeras alterações locais, onde a captação de glicose e a síntese do glicogênio são diminuídas, assim como a sensibilidade à insulina (SOWELL et al., 1989). Ocorre redução da atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose e da expressão gênica dos transportadores de glicose (ELMERNDORF et al., 1997), associada ao processo de atrofia (CODERRE et al., 1992; HENRIKSEN et al., 1991).

O Exercício, em contraste com a imobilização, aumenta a sensibilidade à insulina em humanos e em ratos (HAYASHI et. al., 1997; KIM et. al., 1995).

Na musculatura esquelética, o transporte de glicose é mediado pela proteína transportadora de glicose GLUT-4. A atividade contrátil afeta consideravelmente o metabolismo da glicose e a resposta à insulina na musculatura esquelética. Durante a contração muscular, a captação de glicose é aumentada proporcionando um aumento do transporte da glicose para o interior do músculo favorecendo a via glicolítica. Imediatamente após a atividade contrátil, a captação da glicose pelo músculo permanece elevada e é canalizada, primeiramente, para o reabastecimento dos estoques de glicogênio. Embora a insulina não seja solicitada para o aumento da captação de glicose depois da atividade contrátil a dose necessária para a estimulação da captação da glicose pela musculatura esquelética é diminuída,

sugerindo um aumento na sensibilidade à insulina pelo tecido muscular esquelético (DAVIS & KARL 1988). A insulina aumenta o transporte de glicose pela translocação de moléculas GLUT-4 provenientes de depósitos intracelulares para a membrana plasmática (GUMÁ et al., 1995).

Na busca da compreensão dos processos que levam à resistência à insulina, vários modelos foram propostos nas últimas décadas, dentre estes, a desnervação do músculo esquelético. O exato mecanismo molecular de sinalização intracelular, que é mediado pelo receptor da insulina e que resulta em diversas respostas biológicas, foi apenas parcialmente elucidado nesse modelo de desnervação (BERTELLI et al., 2003).

Segundo Turinsky (1987), o efeito da desnervação no metabolismo muscular é influenciado pela população de fibras musculares e o fenômeno da desordem metabólica provocada pela desnervação inicia-se entre 3 a 6 horas após a secção do nervo. A secção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina, mostrada primeiramente por Buse e Buse em 1959. Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura desnervada (BERTELLI et al., 2003).

Vários estudos relacionados com atividade física demonstram que exercícios regulares aeróbicos e de força atenuam a intolerância à glicose e aumentam a sensibilidade à insulina em adultos sedentários e diabéticos não dependentes de insulina (HOUMARD et al., 1993; SMUTOK et al., 1994; COX et al., 1999).

Por outro lado, poucos estudos abordam os efeitos das alterações musculares decorrentes da imobilização de longa duração por desnervação sobre a manutenção da homeostase glicêmica pelo organismo como um todo. Mais raros ainda são os estudos que avaliam os efeitos do treinamento físico sobre a musculatura desnervada e a homeostase glicêmica.

Assim sendo, o presente estudo visou analisar os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação de longa duração do músculo esquelético no metabolismo glicídico de ratos, submetidos ou não à natação.

#### 5.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 3 a 5 meses fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, SP. Os animais tiveram livre acesso e ração (Purina para roedores) e à água “*ad libitum*”, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h à temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C. Os animais foram tratados de acordo com o Guide for care use of laboratory animals (National Research Council, 1996).

Para a desnervação, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico, (Thiopental, ABBOTT, SP), na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal e tricotomizados na porção posterior das coxas por onde uma porção do nervo ciático, de aproximadamente 1 cm, da pata direita foi seccionada e retirada, segundo o modelo de desnervação proposto por Coderre et al, 1992. Após 28 dias da desnervação, nova incisão foi feita na porção posterior da coxa da pata desnervada, onde por inspeção visual, certificou-se de que não houve reinervação da porção seccionada do nervo ciático. Os ratos foram divididos em 4 grupos; Controle: animal intacto; Desnervado 28 dias: analisado 28 dias após a desnervação; controle/natação: animal intacto submetido a 28 dias de treinamento físico; Desnervado 28 dias/natação: analisado após 28 dias da desnervação e treinamento físico. O treinamento físico consistiu de natação 1 hora/dia, 5

dia/semana, em tanques coletivos contendo água a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , realizado no período da manhã (8:00 – 9:00 hs).

Numa primeira série de experimentos, o metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado foi verificado após sacrifício dos animais por decapitação, em repouso, após 48 horas da última sessão de treino. O músculo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25 – 35 mg foram primeiro incubadas por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  em banho Maria de Dubinoff (FANEN, MODELO 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%; HEPES 6,64 mM; KCl 0,032%  $\text{CaCl}_2$  1,14 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,015%;  $\text{NaHCO}_3$  0,19%;  $\text{MgSO}_4$  0,03%) equilibrado com a mistura de 95%  $\text{O}_2$  – 5%  $\text{CO}_2$ , pH 7,4. Após este período, as fatias musculares foram transferidas para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [ $\text{U}^{14}\text{C}$ ] glicose, 0,25 mCi/mL e [ $3\text{H}$ ] 2-deoxiglicose (2DG, 0,5  $\mu\text{Ci/mL}$ ) e insulina (100  $\mu\text{M/mL}$ ). Dentro do frasco externo, foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700 $\mu\text{L}$  de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nessa última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa de plástico, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema, contendo as fatias de músculo, foi incubado em banho Maria de Dubinoff por 60 min. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do  $\text{CO}_2$  foi estimulada pela injeção de 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e o  $\text{CO}_2$  foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ . A

incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do  $^{14}\text{C}$  no precipitado obtido durante o processo de extração do glicogênio muscular (SJORGREEN et al., 1938). A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radiatividade do  $^{14}\text{C}$  no líquido contido no frasco interno. A captação da glicose (2DG) foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do  $^3\text{H}^+$ . Toda a medição da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno. Em série separada de experimentos, usando ratos na mesma condição da série anterior, a resposta à insulina exógena foi avaliada através do teste de tolerância à insulina intravenosa (ittiv). Animais de todos os grupos receberam insulina (mista regular purificada), injetada na veia peniana na concentração de 1UI/mL na dose de 1UI/Kg de peso corporal. Amostras de sangue (100  $\mu\text{l}$ ) foram coletadas a partir da veia femural em seringas de 1 mL antes (tempo 0) e após 2:30, 5:00, 10:00, e 20:00 (min:s) da administração da insulina, para determinação da glicose sérica. A taxa de remoção de glicose (Kitt), durante o teste de tolerância à insulina, foi calculada de acordo com Lundbaek (1962), utilizando-se o programa de computador ORIGIN® 6.0. A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey, onde apropriado. Em todos os casos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 RESULTADOS

Na primeira série de experimentos, observou-se aumento da captação de glicose pelo músculo sóleo tanto da pata desnervada quanto da pata contralateral dos animais submetidos a exercício de natação após 28 dias em relação ao animal controle (figura 1). O mesmo ocorreu com o animal controle submetido ao exercício de natação por 28 dias (figura 1). Em contrapartida, não houve diferença na captação da glicose pelo músculo sóleo tanto da pata desnervada quanto da pata contralateral entre o grupo desnervado sedentário e o grupo controle intacto mantido sedentário (Figura 1).

Foram, ainda, analisadas a oxidação da glicose e a incorporação da glicose em glicogênio (síntese), pelo músculo sóleo isolado. Não houve diferença na oxidação da glicose, entre as patas desnervada e contralateral dos animais desnervado por 28 dias sedentários, e o grupo de animais controle intacto sedentário (Figura 2). Por outro lado, a oxidação da glicose aumentou significativamente tanto no grupo de animais controle submetidos a natação, quanto no grupo de animais desnervados submetidos a exercício de natação. Este aumento ocorreu tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral do mesmo animal (figura 2). Com relação à incorporação da glicose em glicogênio, houve aumento na pata desnervada dos animais após 28 dias de cirurgia, mas não na pata contralateral do mesmo animal em relação aos animais controle intacto. Por outro lado, houve diminuição da incorporação da glicose em

glicogênio no músculo sóleo dos animais desnervados submetidos ao exercício de natação tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral e no sóleo de animais controle intacto submetidos a exercício de natação em relação ao animal controle sedentário intacto (figura 3).

Em uma segunda série de experimentos, foi avaliada a taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt) em ratos submetidos ao teste de tolerância à insulina endovenosa (ittiv). Os resultados obtidos encontram-se na figura 4. Os valores de Kitt dos animais após 28 dias de desnervação submetidos ou não ao exercício de natação, foram significativamente maiores do que os animais controle sedentário intacto e controle submetido ao exercício de natação (figura 4).

## 5.6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a captação de glicose pela musculatura esquelética induzida pelo hormônio insulina, foi aumentada nos grupos controle e desnervado submetidos a exercício de natação. O aumento da captação da glicose pela musculatura é evidenciado tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral dos animais que foram submetidos a desnervação por um período de 28 dias. No entanto, a captação de glicose pelo músculo sóleo dos animais do grupo desnervado após 28 dias mantidos sedentários, bem como do músculo sóleo dos animais do grupo controle sedentário, não mostraram diferenças significativas entre eles. Estudos referentes a desnervação, e sua implicação na captação da glicose pelo músculo esquelético, demonstram que animais que sofreram desnervação do músculo sóleo apresentam diminuição na captação da glicose num período de até 7 dias (TURINSKY, 1987; HIROSE et. al., 2001; TURINSKY & DAMRAU-ABNEY, 1998).

Segundo Wallberg-Henriksson (1987), na desnervação da musculatura esquelética de rato, a resistência à insulina é acompanhada pela diminuição do conteúdo de transportadores de glicose (Glut4). No entanto, Davis & Karl, 1988, verificaram em seus experimentos que a captação da glicose no músculo sóleo aumentava após o sétimo dia de desnervação e continuava a aumentar ainda mais ao décimo dia após a desnervação. Estes achados mostram que, o músculo sóleo desnervado, adapta-se ao

estado desnervado, proporcionando uma recuperação na captação da glicose, igualando à situação dos animais controle. A contração e a insulina têm um efeito aditivo no transporte da glicose no músculo esquelético, sugerindo que os dois agem estimulando vias parcialmente independentes (IHLEMANN et al., 1999). O treinamento físico aumenta a expressão de Glut-4 na musculatura esquelética e melhora a tolerância a glicose e a ação da insulina no organismo como um todo (CHIBALIN, et al., 2000). O exercício tem múltiplos efeitos no metabolismo da glicose e na translocação de transportadores de glicose. No entanto, o mecanismo pelo qual a atividade física, aumenta a responsividade à insulina e o transporte da glicose no músculo esquelético ainda estão por se totalmente esclarecidos (CHIBALIN, et al., 2000).

O exercício físico é um estímulo para a regulação dos processos metabólicos na musculatura esquelética favorecendo a captação de glicose a síntese e a protéica que são fundamentais para a homeostase muscular (SAKAMOTO & GOODYEAR, 2002). Neste trabalho pudemos observar que o aumento da captação de glicose foi evidente no músculo sóleo de animais controles submetidos à natação e este aumento foi também verificado no músculo sóleo da pata contralateral e desnervada dos animais que foram submetidos ao exercício de natação. Estes dados sugerem que os mecanismos de sinalização interna da musculatura esquelética, que proporcionam a captação da glicose provavelmente são recuperados nos animais desnervados depois de um período de 28 dias, e que o exercício físico tem um papel fundamental na melhora da captação da glicose no músculo sóleo. Isso provavelmente é devido ao aumento da sensibilidade a insulina proporcionada pela atividade física como também na estimulação da neuregulina (SUAREZ et al., 2001). A captação da glicose pelo músculo sóleo se faz através das isoformas dos transportadores sensíveis ou não a insulina cuja

função é transportar a glicose para o citosol. A regulação da captação da glicose na musculatura esquelética ocorre de varias maneiras, onde a insulina, a atividade metabólica do tecido e a atividade contrátil das fibras musculares são fundamentais. No músculo, a insulina promove a translocação de Glut-4 para a membrana celular, elevando a captação de glicose que pode ser oxidada ou direcionada para a formação dos estoques de glicogênio (KLIP & MARETTE, 1992). Por essa razão, neste estudo foram analisadas a oxidação da glicose e a incorporação da glicose em glicogênio dos animais dos diferentes grupos experimentais. A oxidação da glicose na musculatura esquelética foi aumentada nos animais que foram submetidos ao exercício físico por natação tanto na pata contralateral quanto na pata desnervada. Igual fenômeno foi observado nas patas dos animais controle treinados (figura 2). Estes dados estão de acordo com a literatura que indica melhoria do condicionamento aeróbio com o exercício moderado (MATZINGER et al, 2002). No entanto, não houve diferença na oxidação da glicose entre os animais controle e os animais desnervados após 28 dias mantidos sedentários.

Por outro lado, a incorporação da glicose em glicogênio foi diminuída nos animais que foram submetidos à atividade física tanto no grupo controles quanto no grupo desnervado após 28 dias, em relação ao controle e ao grupo desnervado após 28 dias mantidos sedentários (figura 3). Estes resultados demonstram a priorização da via glicolítica no exercício em detrimento a síntese de glicogênio. Alternativamente, o período de 48 h decorrido entre a última sessão de treinamento e o sacrifício dos animais, pode ter sido insuficiente para a reposição do glicogênio muscular, conduzindo aos baixos valores observados nos ratos exercitados.

Mudanças bioquímicas observadas na desnervação incluem variação na concentração e na atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na fosforilação. O aumento da concentração de AMPc, da proteína Kinase dependente de AMPc e da atividade da adenilciclase são verificadas em músculo desnervado como também observa-se uma redução da atividade da glicogênio sintase e na glicogênio fosforilase (FROSTICK, 1995, WALLIS, 1999). Essas mudanças se iniciam após poucas horas de desnervação da musculatura esquelética e variam de acordo com o tipo de fibra muscular. No entanto, os resultados obtidos nos animais sedentários, neste experimento com relação à oxidação e a incorporação da glicose em glicogênio demonstram que houve recuperação dos processos metabólicos que envolvem a glicose no desnervado crônico.

Após estas constatações, iniciamos a análise do efeito da desnervação e do exercício sobre a taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt) nos animais desnervados e íntegros. A taxa de remoção da glicose após administração da insulina exógena foi significativamente aumentada nos ratos após 28 dias de desnervação submetidos ou não ao exercício de natação em relação aos controles íntegros. Estes dados demonstram que a resposta da glicose à insulina exógena é alterada em animais desnervados e que a sensibilidade à insulina é maior quando a musculatura após 28 de desnervação é submetida a exercício de natação.

## **5.7 CONCLUSÃO**

Concluindo, o conjunto de nossos resultados indica que alterações restritas do metabolismo glicídico muscular influenciaram significativamente a resposta à insulina do animal como um todo. Além disso, o exercício melhorou o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado.

## **5.8 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio pela assistência técnica e as fundações Brasileiras de suporte financeiro a pesquisa: FAPESP, CNPq e Capes.

## 5.9 REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

BERTELLI, D.F.; UENO, M.; AMARAL, M.E.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; CARVALHO, C.R.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A. C. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 284(4): pE679-87, 2003.

BOOTH, F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **Journal. Applied. Physiology**, v.52: p1113 – 1118, 1982.

BUSE, M.G.; BUSE, J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. **Diabetes**. May-Jun;8(3):p218-25, 1959

CHIBALIN AV, 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**, v.4; 97(1):p38-43, 2000.

---

<sup>2</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – NBR 6023/2002

CODERRE, L.; MONFAR, M.M.; CHEN, K.S.; HEYDRICK, S.J.; KUROWSKI, T.G.; RUDERMAN, N.B. & PICH, P.F. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. **Endocrinology**. v.131 (4): p1821-1825, 1992.

COX J.H., CORTRIGHT R.N., DOHM G.L.,HOUMARD J.A. Effect of aging on response to exercise training in humans: skeletal muscle Glut-4 and insulin sensitivity. **Journal Applied Physiology**. v. 86:P2019 – 2025, 1999.

DAVIS, T. A. & KARL, I. E. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in denervated muscle. **Biochem. J**. v. 254, p667-675.1988.

ELMENDORF, J.S.; DAMRAU-ABNEY, A.; SMITH, T.R.; DAVID, T.S.; TURINSKY, J. Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal Physiology**, v. 272(4 Pt 1):pE661-70. 1997.

FERRANDO A.A., LANE H.W.,STUART C.A., DAVIS-STREET J. AND WOLFE R.R.. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. V. 270: pE627 – E 633, 1996.

FROSTICK SP. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. **Int Angiol**. v.14(3):p278-87.1995.

IHLEMANN J, PLOUG T, HELLSTEN Y, GALBO H.; Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. **American Journal Physiology**, v. 277(2 Pt 1): pE208-214. 1999.

GUMÁ, A., ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON AND KLIP, A. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.268 (31): pE613 – E622. 1995.

HAYASHI, T., WOJTASZEWSKI, J.F., AND GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 273: pE1039 – E 1051, 1997.

HENRIKSEN, E.J.;RODNICK, K.J.; MONDON, C.E.; JAMES , D.E.;HOLLOSZY, J.O. Effect of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. **Journal. Applied Physiology**. v.70(5):p2322-2327. 1991.

HENRIKSEN, E. J. AND SAENG SIRISUWAN, V. Exercise training and antioxidants: Relief from oxidative stress and insulin resistance. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v. 31,nº.2, p79 – 84. 2003.

HIROSE, M.; KANEKI, M.;SUGITA, H.;YASUHARA, S.; IBEBUNJO, C.; MARTYN, J.A.; IEBUNJO, C. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. **Metabolism**, v. 50(2): p216-22. 2001.

HOUMAD J.A., SHINEBARGER M. H., DOLAM P.L., LEGGETT-FRAZIER N., BRUNER R.K., MCCAMMON M.R., ISRAEL R.G., DOHM G.L.: Exercise training increase Glut-4 protein concentration I previously sedentary middled-aged men. **American Journal of Physiology**, v. 264: pE896 – E901, 1993.

KIM, Y., INOUE, T.NAKAJIMA, R. NAKAE K.,TAMURA T. TOKUYAMA K. AND SUZUKI M.. Effects of endurance training on gene expression of insulin signal transduction pathway. **Biochem.. Biophys. Res.** v. 210: p766 – 773. 1995.

KLIP A, MARETTE A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. **J Cell Biochem**; v. 48(1): p51-60, 1992.

LUNDBAEK K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J.** Jun v.2;5291:p1507-13. 1962

MATZINGER O, SCHNEITER P, TAPPY L. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 282(1): pE125-31, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory. National Academy Press, Washington, DC, USA.

PLOUG T., OHKUWA T., HANDBERG A., VISSING J., AND GALBO H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 268: pE980 – E986, 1995.

SAAD, M. J. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian Journal. Medical Biology Research**, v. 27(4): p941 – 957.1994.

SAKAMOTO K, GOODYEAR LJ. Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**. Jul; v.93(1):p369-83. 2002.

SHANGRAW R.E., STUART C.A., PRINCE M.J., PETERS E.J., AND WOLFE R.R. Insulin responsiveness of protein metabolism in vivo following bed rest in humans. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.255: pE548 – E558, 1988.

SJORGREEM, B.; NORDENSKJOLD, D.T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Beitrag zur Kenntnis des Leberhythmus. **Pflüger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere**, 240;247, 1938.

SMUTOK M.A., REECE C., KOKKINOS P.F., FARMER C.M., DAWSON P.K., DEVANE J., PATTERSON J., GOLDBERG A.P., HURLEY B.F.: Effects of exercise training modality on glucose tolerance in men with abnormal glucose regulation. **Int. J. Sports Med.**, v. 15, No. 6, p283 – 289, 1994.

SUAREZ E, BACH D, CADEFAU J, PALACIN M, ZORZANO A, GUMA A. A novel role of neuregulin in skeletal muscle. **J Biol Chem** May 25;276(21):18257-64, 2001.

SOWELL, M. O.; DUTTON, S.L.; BUSE, M.G., (1989), Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. **American Journal Physiology**. v. 257:pE418 –E425.

STEIN T.P., SCHULTER M.D. AND BODEN G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. **Aviat Space Environ. Med.** 65: p1091 – 1096, 1994.

STUART C.A., SHANGRAW R.E., PRINCE M.J., PETERS E.J. AND WOLFE R.R. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. **Metabolism**, v. 37: p802 – 806, 1988.

TURINSKY, J. (1987), Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal and Physiology**. Mar;252(3 Pt 2):pR531-7, 1987.

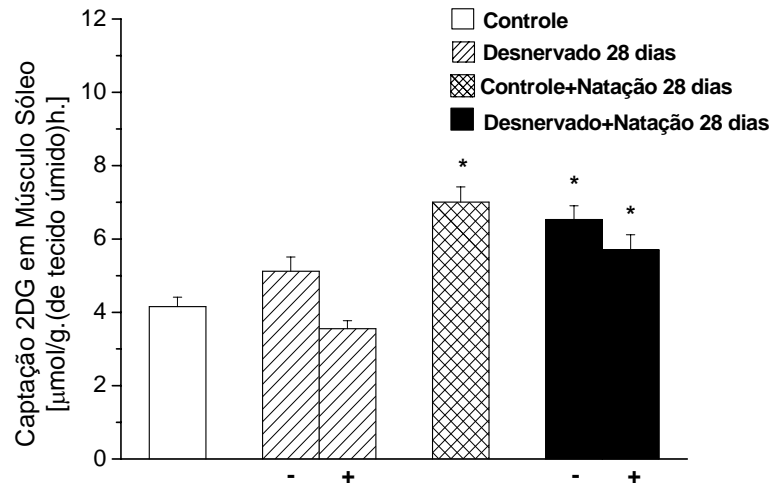
TURINSKY J. & DAMRAU-ABNEY A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. **American Journal and Physiology**, v.275 (5pt2): pR1425 – R1430. 1998.

WALLBERG-HENRIKSSON, H. Glucose transport into skeletal muscle: influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** 564: p1 - 80, 1987.

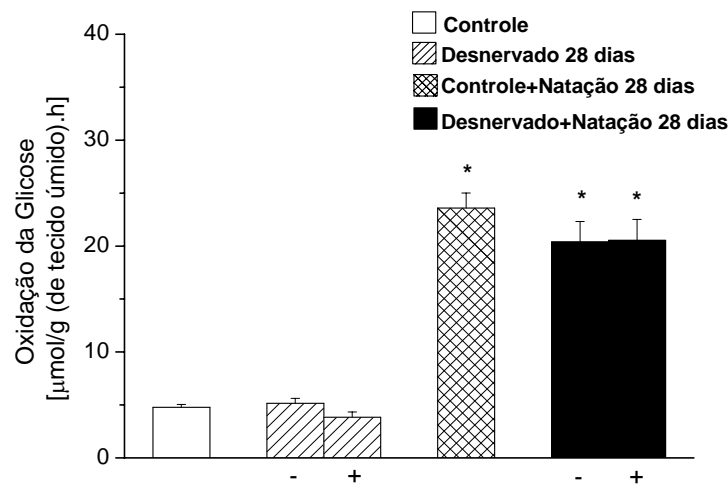
WALLIS MG, APPLEBY GJ, YOUNG JM, CLARK MG, PENSCHOW JD. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. **Life Science**, v.64(4):p221-8. 1999.

WHITE, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking protein that mediate insulin action and cytokine action. **Recent. Prog. Horm. Res.** 53: p119-133, 1998.

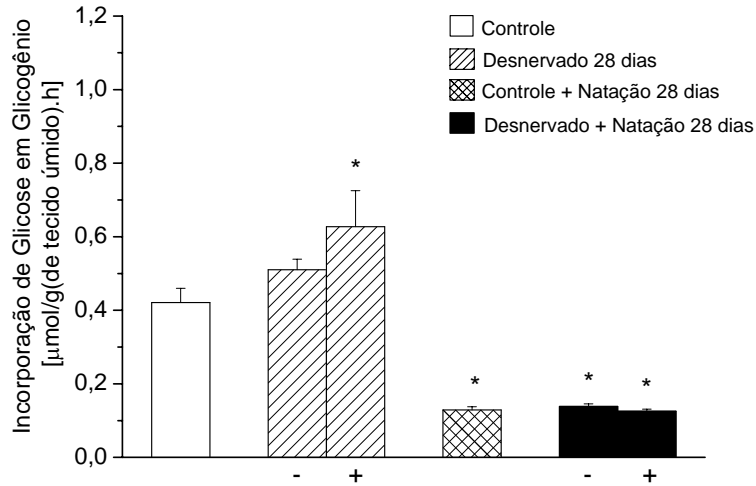
## 5.9.1 FIGURAS



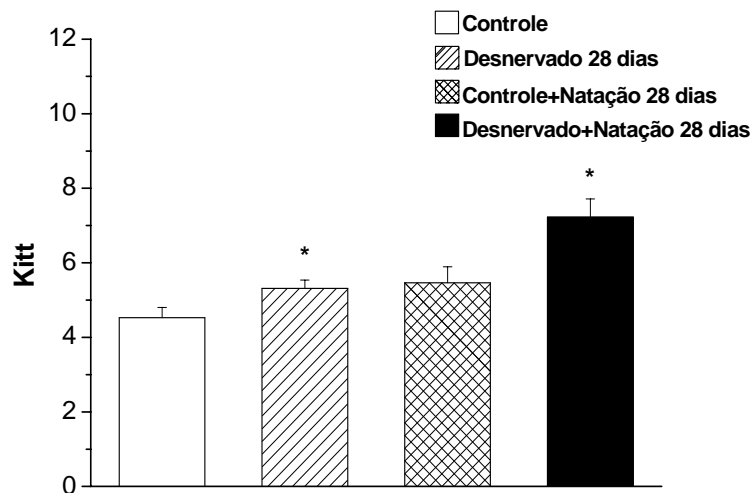
**Figura 1:** Captação de glicose pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos. O sinal (+) refere-se a pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde a pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 7$  a 10 fatias musculares.



**Figura 2:** Oxidação da glicose pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde à pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 8$  a 10 fatias musculares.



**Figura 3:** Incorporação da glicose em glicogênio pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde à pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 10$  a 13 fatias musculares.



**Figura 4:** Taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt), durante o teste de tolerância à insulina (média  $\pm$  erro padrão) em ratos. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 8$  a 10 animais por grupo.

## **6. CAPÍTULO III**

### **EFEITO DA DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA E O METABOLISMO DA GLICOSE EM RATOS.**

Wilton Marlindo Santana Nunes, Maria Alice Rostom de Mello.

*Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro, SP, Brasil.*

#### **6.1 RESUMO**

A desnervação do músculo esquelético implica em alterações metabólicas locais que incluem diminuição da captação de glicose e da síntese de glicogênio, bem como dos estoques desse substrato. Tais alterações aparecem associadas à inibição das etapas iniciais da sinalização da insulina e resistência à ação do hormônio. Por outro lado, pouco se sabe sobre os efeitos sistêmicos da imobilização por desnervação. O presente estudo visou analisar os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação sobre a secreção de insulina e a homeostase glicêmica. Ratos da linhagem wistar com 3 a 5 meses de idade foram submetidos à secção do nervo ciático da pata esquerda. Após 3, 7 e 28 dias, fatias do músculo sóleo desnervado e da pata contralateral foram extraídas e incubadas em presença de 5 mM de glicose, contendo [<sup>3</sup>H]2-deoxiglicose, e 100 μU/mL de insulina para a análise da captação de glicose. Em série separada de experimento foram também isoladas ilhotas pancreáticas

desses animais e incubadas em presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,6 e 16,7 mmol/L) para análise da secreção estática de insulina. Como controle foram utilizados animais íntegros. Em outro experimento procedeu-se à realização de teste de tolerância à glicose (GTT). Para a realização do GTT os ratos receberam soluções de glicose 50%, 1g/Kg de peso corporal, intravenoso (iv). Foram coletadas amostras de sangue para dosagem de glicose antes e 5, 10, 20, 40, 80 min após a administração da glicose. Os resultados do GTT foram avaliados através da determinação das áreas sob as curvas séricas de glicose ( $\Delta G$ ) durante o teste através da metodologia trapezoidal, com o auxílio do programa de computador ORIGIN® 6.0. Após o teste de tolerância a glicose intravenosa (GTTiv), fatias do tecido hepático e muscular (sóleo) foram separadas para determinação do conteúdo do glicogênio. Observou-se redução da captação de glicose (mmol/g.h) na pata desnervada após 3 e 7 mas não após 28 dias em relação a pata dos animais controle. Não houve diferença significativa após 3 e 7 na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral intacta em relação ao controle. Em contrapartida, verificou-se aumento da captação de glicose nesta mesma pata após, 28 dias. Houve aumento da secreção da insulina (ng/ilhota/90min) nas concentrações da glicose de 8,3mM e 16,7mM após 28 dias de desnervação em relação as mesmas concentrações do grupo controle respectivamente. Não houve diferença na área sob a curva de glicose sérica durante o GTTiv e no conteúdo de glicogênio hepático dos grupos. No entanto, o glicogênio muscular tanto da pata desnervada quanto da pata íntegra do grupo 28 dias foi reduzido após GTTiv. Também o glicogênio da pata desnervada após 7 dias mostrou-se inferior ao controle. Esses resultados sugerem que a imobilização por desnervação interfere não só no

metabolismo da glicose no músculo esquelético desnervado como também em outros tecidos. Os mecanismos dessa interação precisam, ainda, ser investigados.

**Palavras chaves:** Secreção de insulina, Desnervação, Metabolismo da glicose.

## 6.2 ABSTRACT

Denervation of the skeletal muscle involves local metabolic changes that include a reduction in glucose uptake and glycogen synthesis, as well as in the stocks of this substrate. Such changes appear associated with the inhibition of the initial stages of insulin signals and resistance to action of the hormone. On the other hand, little is known about the systemic effects of immobilization by denervation. This study aimed to analyze the local and systemic effects of immobilization by denervation on the secretion of insulin and glycemic homeostasis. Wistar breed rats aged from 3 to 5 months old were submitted to section of the sciatic nerve in the left paw. After 3, 7 and 28 days, slices of the de-nerved soleus muscle and of the opposite paw were extracted and incubated in the presence of 5 mM of glucose containing [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose, and 100 μU/mL of insulin, in order to analyze glucose uptake. In a series separately from the experiment, pancreatic islets of these animals were also isolated and incubated in the presence of growing concentrations of glucose (2.8; 5.6; 8.6 and 16.7 mmol/L) in order to analyze static insulin secretion. Whole animals were used as controls. In another experiment, the test for tolerance to glucose (GTT) was proceeded with. In order to carry out GTT, the rats received 50% glucose solutions, 1g/Kg of body weight intravenously (iv). Blood samples were collected for glucose dosing before and 5, 10, 20, 40 and 80 min. after glucose administration. The results of the GTT were assessed

by determining the areas under the serum glucose curves ( $\Delta G$ ) during the test, by means of the trapezoidal methodology, with the aid of the computer program ORIGIN® 6.0. After the intravenous glucose tolerance test (GTTiv), slices of the hepatic and muscular (soleum) tissues were separated to determine the glycogenic content. A reduction was observed in the uptake of glucose (mmol/g.h) in the denervated paw after 3 and 7 days, but not after 28 days in relation to the control animal paws. There was no significant difference after 3 and 7 days in glucose uptake by the soleum muscle of the opposite intact paw in relation to the control. On the other hand, there was increased glucose uptake in this same paw after 28 days. There was an increase in insulin secretion (ng/islet/90min) in the glucose concentrations 8.3mM and 16.7mM after 28 days of denervation, in relation to the same concentrations of the control group respectively. There was no difference in the area under the serum glucose curve during GTTiv and the hepatic glycogen content of the groups. However, the muscular glycogen both in the denervated and whole paw of the 28-day group was reduced after GTTiv. Furthermore, the glycogen in the denervated paw after 7 days was shown to be lower than that of the control. These results suggest that immobilization by denervation interferes not only in the metabolism of glucose in the de-nervated skeletal muscle but also in other tissues. The mechanisms of this interaction still require further investigation.

**Key Words:** Insulin secretion, Denervation, Glucose metabolism.

### 6.3 INTRODUÇÃO

A conseqüência mais dramática da desnervação é o processo de hipotrofia que se instala na musculatura esquelética. A hipotrofia é um processo multifatorial afetando não só o mecanismo contrátil uma vez que gera paralisia muscular bem como altera o metabolismo muscular diminuindo tanto a atividade das vias metabólicas quanto a capacidade de absorver inúmeros substratos que dependem e estão associados com a sensibilidade à insulina, isto leva a fraqueza muscular e perda de massa (HUNTER et al., 2002). O músculo esquelético tem um papel fundamental na manutenção das concentrações normais da glicose e na regulação corpórea do metabolismo de carboidratos. O metabolismo da glicose no músculo esquelético é uma das vias mais estudadas por correntes de pesquisadores no mundo todo.

Sabe-se que o tecido muscular responsável pela locomoção necessita de substratos energéticos, sendo carboidratos e lipídios os principais combustíveis requisitados pelo tecido muscular (SINACORE & GULVE,1993). Para que a glicose cumpra o seu papel no músculo esquelético como substrato energético, é necessário que a glicose seja captada.

A captação da glicose pela musculatura esquelética se dá através de diferentes processos. Um deles se inicia com o acoplamento da insulina ao seu receptor específico localizado na membrana da célula muscular, e para que isso ocorra, é

necessária a secreção da insulina pela célula B pancreática. O processo secretório da insulina pela célula B pancreática é estimulado por substratos energéticos metabolizáveis na célula B pancreática, sendo a glicose o secretagogo mais importante. A glicose é transportada para o interior da célula B por uma proteína integral de membrana, denominada transportador de glicose nº 2 (Glut-2). Após entrar na célula B, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P). O destino preferencial da G-6-P na célula B é a glicólise (BOSCHERO, 1996). O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido em Acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH). Subseqüentemente, a acetil-CoA entra no Ciclo de Krebs levando a um aumento de nicotinamida adenina de nucleotídeo (NADH) e flavina adenina de nucleotídeo (FADH<sub>2</sub>). O metabolismo de glicose gera ATP e a fração de ATP/ADP é aumentada no citoplasma. Com o aumento da fração ATP/ADP, os canais de potássio se fecham ocorrendo à despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio, sensíveis a voltagem. O influxo do cálcio para a célula B resulta no processo secretório da insulina (PERALES et al., 1991, RADOSAVLJEVIC et al., 2004).

Após a sua secreção, a insulina se liga ao seu receptor específico na membrana celular das inúmeras células onde a musculatura esquelética é a principal delas. Ao se ligar no receptor específico na musculatura esquelética, a insulina ativa múltiplas vias sinalizadoras através da fosforilação do resíduo de tirosina específico na porção beta intracelular do receptor de insulina (HIROSE et al., 2001). Este acoplamento entre a insulina e seu receptor específico desencadeia uma reação em cascata intracelular que culmina na translocação dos GLUT-4 para a membrana e posterior entrada da glicose na célula. O Segundo processo pelo qual a glicose entra na célula muscular é pela contração que culmina no processo de translocação do GLUT-4

até a membrana plasmática da célula muscular e posterior entrada da glicose. O terceiro processo é através do GLUT-1, transportador responsável pela captação da glicose para a manutenção do metabolismo basal do tecido muscular. É importante salientar que a captação da glicose através do GLUT-1, não é dependente da insulina e nem do processo contrátil da musculatura. Após a glicose ser captada pelos GLUT-4 e ou GLUT-1, segue-se à via de armazenamento em glicogênio ou via glicolítica (oxidação) para a produção de energia (ATP). A função do GLUT-1 é captar glicose suficiente para manter o metabolismo basal do tecido muscular esquelético em repouso (HIROSE et al., 2001).

Na busca da compreensão dos processos que levam à resistência à insulina, vários modelos foram propostos nas últimas décadas, dentre estes, a desnervação do músculo esquelético. O exato mecanismo molecular de sinalização intracelular, que é mediado pelo receptor da insulina e que resulta em diversas respostas biológicas, foi apenas parcialmente elucidado nesse modelo de desnervação (BERTELLI et al., 2003).

Segundo Turinsky (1987), o efeito da desnervação no metabolismo muscular é influenciado pela população de fibras musculares e o fenômeno da desordem metabólica provocada pela desnervação inicia-se entre 3 a 6 horas após a secção do nervo. A interrupção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina, mostrada primeiramente por Buse e Buse (1959). Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura desnervada, sendo o músculo da pata contralateral utilizado como controle (BERTELLI et al., 2003).

Vários estudos sobre desnervação da musculatura esquelética e seu efeito sobre o metabolismo da glicose vem sendo feitos no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos no metabolismo e resistência a glicose. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da desnervação da musculatura esquelética sobre a secreção da insulina e a homeostase glicêmica. Este estudo traz uma contribuição no que se refere à secreção de insulina *in vitro* de animais submetidos a desnervação do músculo sóleo e o efeito desta desnervação na homeostase glicêmica.

#### 6.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 3 a 5 meses fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, SP. Os animais tiveram livre acesso ao alimento (ração Purina para roedores) e a água “*ad libitum*”, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12h à temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C. Os animais foram tratados de acordo com o Guide for care use of laboratory animals (National Research Council, 1996).

Para a desnervação, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico, (Thiopental, ABBOTT, SP), na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal e tricotomizados na porção posterior das coxas por onde uma porção do nervo ciático, de aproximadamente 1 cm, da pata direita foi seccionada e retirada, segundo o modelo de desnervação proposto por Coderre et al, 1992.

Os ratos foram divididos em quatro grupos; controle: animais intactos; desnervado 3 dias: animais analisados após 3 dias da desnervação; desnervado 7 dias: animais analisados após 7 dias da desnervação e desnervado 28 dias: animais analisados 28 dias após a desnervação. Numa primeira serie de experimentos, o metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado foi verificado após sacrifício dos animais por decapitação, em repouso. O músculo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25 – 35 mg foram primeiro incubadas por 30

min a 37° C em banho Maria de Dubinoff (FANEN, MODELO 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%; HEPES 6,64 mM; KCl 0,032% CaCl<sub>2</sub> 1,14 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,015%; NaHCO<sub>3</sub> 0,19%; MgSO<sub>4</sub> 0,03%) equilibrado com a mistura de 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>, pH 7,4. Após este período, a fatia muscular foi transferida para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [U-<sup>14</sup>C] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2DG, 0,5 µCi/mL) e insulina (100 µM/mL). Dentro do frasco externo, foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700µL de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nessa última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa de plástico, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema, contendo as fatias de músculo, foi incubado em banho Maria de Dubinoff por 60 min. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO<sub>2</sub> foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e o CO<sub>2</sub> foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37°C. A incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no precipitado obtido durante o processo de extração do glicogênio muscular (SJORGREEM et al., 1938). A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no líquido contido no frasco interno. A captação da glicose (2DG) foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do <sup>3</sup>H+. Toda a medição da radioatividade foi feita em contador

PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno.

Numa segunda série de experimentos, as ilhotas pancreáticas foram isoladas seguindo-se técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (1965), aplicada a pâncreas murino por LACY & KOSTIANOVSKY (1967), com as modificações introduzidas por BOSCHERO, DELATRE & SANTOS (1981) e SUTTON et al.,(1986). Em cada experimento, um a três ratos foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 mL da solução de HANKS (HANKS), contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando, por fluxo retrogrado, a divulsão do tecido acinoso. Procedeu-se, então a ablação do pâncreas, que foi transferido para tubo de ensaio de vidro (12 × 2 cm) e incubado por cerca de 18 min a 37 °C.

Em seguida, ainda a 37°C, o conteúdo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em becker. Após mistura com HANKS (ca. 80 mL), foi lentamente aspirado e ejetado com seringa (3x ca. 50 mL) e, decantado durante 3 min. O sobrenadante foi então descartado, e o sedimento ressuspensado em HANKS (ca. 80 mL). Após repetir essa operação por quatro vezes, o produto final foi transferido para placa de Petri, de onde, sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos quatro grupos experimentais, foram coletadas alternadamente (grupo de quatro) em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 mL da solução-tampão de

KREBS-RINGER suplementada com albumina bovina, à qual adicionou-se glicose ( 5,6 mM). Após incubação por 45 min (pré-incubação), a 37<sup>0</sup>C em atmosfera de carbôgenio pH 7,4, a solução de KREBS foi substituída por 1,0 mL do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose; 2,8 (G2,8); 5,6 (G5,6); 8,3 (G 8,3); 16,7 (G 16,7) mmol/L. Procedeu-se a nova incubação , por 90 min, nas condições referidas acima. Após este período, as placas foram colocadas em freezer (-20) por 10 min e, o sobrenadante, de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservados a -20<sup>0</sup>C, até o momento da dosagem da insulina secretada.

A insulina plasmática e a secretada durante o período de incubação por ilhotas isoladas foram avaliadas de acordo com o método descrito por HERBERT, (1965), modificado por SCOTT et al.,(1981).

Em série separada de experimentos, usando ratos nas mesmas condições das séries anteriores, a tolerância à glicose em vivo foi avaliada através do teste de tolerância à glicose intravenosa (GTTiv). Animais de todos os grupos receberam glicose, injetada na veia peniana na concentração de 0,5g/mL na dose de 1g/Kg de peso corporal. Amostras de sangue (100 µl) foram coletadas a partir da veia femoral em seringas de 1 mL antes (tempo 0) e após 5:00, 10:00, 20:00, 40:00 e 80:00 (min:s) da administração da glicose, para determinação da glicose sérica. O teste de tolerância à glicose, foi calculado de acordo com LUNDBAEK (1962) utilizando-se o programa de computador ORIGIN® 6.0. Após o término do GTTiv, alíquotas do tecido hepático e muscular (músculo sóleo) dos grupos foram transferidas para tubos de centrifuga (15mL) e, a seguir, digeridos com KOH 30% em banho fervente. Decorrido a digestão, adicionou-se 0,2 e 0,1 mL da solução de sulfato de sódio saturada no tecido hepático e muscular, respectivamente. Em seguida adicionou-se 7 mL de etanol no tubo contendo

o tecido hepático e 3,5 mL no tubo do tecido muscular. Os tubos foram agitados e, a seguir, centrifugados a 2500 rpm durante 5 min. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante e resuspendeu-se o conteúdo restante com água destilada para procedimento de avaliação do glicogênio por colorimetria com fenol e ácido sulfúrico (LO SIU et al., 1970).

A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey, onde apropriado. Em todos os casos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6.5 RESULTADOS

Na primeira série de experimentos, observou-se redução significativa da captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 7 dias, em relação ao grupo controle (figura 1). Por outro lado, não houve diferenças significativas na pata desnervada após 3 e 28 dias em relação ao grupo controle. A captação de glicose foi também avaliada no músculo sóleo da pata contralateral dos grupos controle e desnervado após 3, 7 e 28 dias. Os resultados mostraram que não houve alteração na pata contralateral intacta dos animais desnervados após 3 e 7 dias. Em contrapartida, verificou-se aumento significativo na captação da glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral do animal desnervado após 28 dias em relação ao animal controle (figura 1).

A seguir avaliamos a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de ratos dos quatro diferentes grupos, e incubadas na presença de concentrações crescentes de glicose (2,8 mM, 5,6 mM, 8,3mM e 16,7 mM)(figura 2). Não houve diferença significativa na secreção da insulina por ilhotas isoladas sob as concentrações de 2,8mM e 5,6mM de glicose em relação aos quatro grupos. Em contrapartida, houve um aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose nas concentrações de 8,3mM e 16,7mM no grupo desnervado após 28 dias em relação ao grupo controle, indicando um aumento da sensibilidade à glicose. Por outro lado, não

houve alteração na secreção da insulina nas concentrações de 8,3mM e 16,7mM dos grupos desnervados após 3 e 7 dias em relação ao controle (figura 2).

Após a confirmação da sensibilidade da ilhota de Langerhans aos procedimentos de desnervação do músculo esquelético, realizamos outra série de experimentos para efetuar o teste de tolerância à glicose intravenosa nos grupos. Os resultados do teste foram avaliados pela estimativa da área sob as curvas de glicose sérica. Não foi constatada nenhuma alteração significativa diferente entre os grupos (figura 3).

O tecido hepático e muscular tem importância excepcional no metabolismo da glicose, e por esta razão, verificamos os teores hepático e muscular de glicogênio após o teste de tolerância à Glicose intravenosa, visando avaliar os efeitos da glicose exógena. Os resultados mostraram uma variação não significativa nos estoques de glicogênio hepático dos quatro grupos analisados (figura 4).

O músculo sóleo teve seus estoques de glicogênio diminuídos após a sobrecarga de glicose intravenosa em ambas as patas, desnervada e integra, no grupo desnervado após 28 dias em relação ao controle. Foi observada diminuição dos estoques de glicogênio na pata desnervada em relação ao controle do grupo desnervado após 7 dias (figura 5).

## 6.6 DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos que houve variação na captação da glicose no músculo sóleo induzida pela insulina. Animais após 7 dias de desnervação, tiveram a captação de glicose diminuída pelo músculo sóleo da pata desnervada. Em contrapartida, a pata contralateral permaneceu com valores próximos aos da pata do animal controle. Esta diminuição da captação da glicose pelo músculo após 7 dias de desnervação, está relatada na literatura. Estudos demonstraram diminuição da captação de glicose na musculatura esquelética de ratos desnervado após 3 dias e 7 dias (TURINSKI, 1987, HIROSE et al., 2001, TURINSKY & DAMRAU-ABNEY, 1998, NUNES & MELLO, 2005). O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição na captação de glicose em músculos de patas desnervados por 3 e 7 dias está relacionado, em parte, à alteração dos mecanismos internos da cascata de reações químico-enzimáticas que culminam na translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (BERTELLI et al., 2003 e HIROSE et al., 2001). Não houve alteração na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 28 dias. Por outro lado, a captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral desse mesmo grupo foi significativamente maior do que a pata do controle intacta. Davis & Karl, 1988, verificaram em ratos que o transporte de glicose no músculo esquelético desnervado na presença de insulina reduzia-se entre o 3º e 7º dia de desnervação, aumentava após 7

dias e aumentava ainda mais ao 10º dia de desnervação. A redução no transporte da glicose em resposta à insulina entre o 3º e o 7º dia de desnervação sugere resistência à insulina no músculo esquelético desnervado, com um retorno da resposta normal à insulina a partir do 10º dia desnervado (DAVIS, T.A. & KARL, I. E, 1988).

A desnervação inibe múltiplos aspectos do metabolismo da glicose na musculatura esquelética, além da captação da glicose, incorporação da glicose em glicogênio, conteúdo da glicose-6-fosfato e atividade da enzima glicogênio sintase (BURANT et al., 1984). Essas mudanças têm sido atribuídas às perdas do fator trófico derivado do nervo e/ou da estimulação elétrica pelo nervo (DAVIS, T. A. & KARL, I.E., 1988).

O músculo esquelético tem um papel essencial na manutenção da homeostase glicêmica (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987). A variação das concentrações da glicose na corrente sanguínea é o fator mais importante na indução da secreção da insulina pela célula beta pancreática (HERBER et al., 2001). A desnervação da musculatura esquelética altera a dinâmica de captação periférica da glicose podendo influenciar a concentração da glicose na corrente sanguínea e, com isso, afetar o processo secretório na célula beta pancreática.

Analisamos, então, a secreção da insulina de ilhotas de Langerhans isoladas dos grupos experimentais sob concentração crescentes de glicose. O aumento de secreção de insulina no grupo desnervado após 28 dias nas concentrações 8,3 mM e 16,7mM, em relação ao grupo controle mostrando um aumento da resposta da ilhota a concentrações elevadas de glicose. A resistência à insulina observada em músculo desnervado desenvolve-se rapidamente pela diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina observado em poucas horas após ter sido desnervado

(WALLBERG-HENRIKSOON, 1987, WILKES, J., and BONEM A., 2000). No entanto, a expressão de GLUT-1 na membrana celular de animais submetidos a desnervação da musculatura esquelética é aumentada. Este aumento ocorre devido à inibição da proteína quinase C a qual favorece o aumento da expressão do GLUT-1. O aumento de transportadores GLUT-1 na membrana da célula muscular, é uma importante tentativa de melhorar a captação da glicose e restabelecer a homeostase glicêmica. No entanto, esta tentativa de aumentar a captação da glicose pelo músculo através do GLUT-1 não é suficiente para restabelecer a homeostase glicêmica ante a desnervação (HUNTER et al., 2002, BOSCH et al., 2003, GASTER et al., 2000). A tentativa de restabelecimento da homeostase glicêmica parece ser complementada pelo aumento da resposta das células beta, à glicose, o que facilita a secreção do hormônio.

Para avaliar a homeostase glicêmica “in vivo”, submetemos os animais ao teste de tolerância à glicose intravenosa e analisamos os conteúdos de glicogênio hepático e muscular após o GTTiv. Não houve alteração nos valores da área sob a curva de glicose sérica durante o GTTiv. Isso indica preservação da homeostase glicêmica. O conteúdo do glicogênio hepático após a sobrecarga intravenosa de glicose, também não foi afetado. No entanto, o conteúdo de glicogênio do músculo sóleo de ambas as patas do grupo desnervado após 28 dias como a pata desnervada após 7 dias foram diminuídas. Estes resultados mostram que os efeitos sistêmicos e alterações no metabolismo da glicose no músculo sóleo decorrentes da desnervação são conflitantes e intrigantes, necessitando de maiores investigação.

## **6.7 CONCLUSÃO**

O conjunto de resultados do presente estudo é indicativo de que a desnervação do músculo esquelético além de provocar alterações locais no metabolismo da glicose produz alterações em outros tecidos. Essas alterações incluem aumento da sensibilidade das ilhotas de Langerhans a concentrações de glicose acima dos basais. Essa alteração observada nas ilhotas pode ser útil na preservação da homeostase glicêmica.

## **6.8 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio pela assistência técnica e as fundações Brasileiras de suporte financeiro a pesquisa: FAPESP, CNPq e Capes.

## 6.9 REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

BERTELLI, D.F.; UENO, M.; AMARAL, M.E.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; CARVALHO, C.R.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A. C. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, Apr;284(4):E679-87, 2003.

BOSCH, R.R.; BAZUINE, M.; WAKE, M.M.; SPAN, P.N.; OLTHAAR, A.J.; SCHURMANN, A.; MAASSEN, A.J.; HERMUS, A.D.R.M.M.; WILLEMS, P.H.G.M. AND SWEEP, C.G.J. Inhibition of Protein Kinase C $\beta$ II Increases Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes through Elevated Expression of Glucose Transporter 1 at the Plasma Membrane. **Molecular Endocrinology** 17(7): 1230 -1239. 2003.

BOSCHERO, A..C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. **Arq Bras Endocrinol Metabo** 40: 149 – 155, 1996.

---

<sup>3</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – NBR 6023/2002

BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E.; SANTOS M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. **Hormone Metabolism Research**, Sep;13(9):531-2, 1981.

BURANT, C.F.; LEMMON S.K.; TREUTELAAR, M.K.; BUSE, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. **American Journal Physiology**, Nov;247(5 Pt 1):E657-66, 1984.

BUSE, M.G.; BUSE, J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. **Diabetes** ; 8:218-25. 1959.

DAVIS, T. A. & KARL, I. E. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in desnervated muscle. **Biochemistry J.** 254, 667-675, 1988.

GASTER, M.; FRANCH, J.; STAEHR, P.; BECK-NIELSEN, H.; SMITH, T.; SCHRODER, H.D. Induction of GLUT-1 protein in adult human skeletal muscle fibers. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism.** 2000 Nov;279(5):E1191-5, 2000.

HERBER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Secreção de Insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por Ácido graxos. **Arq Bras Endócrinol Metab** Vol 45 nº 3: 219 – 227, 2001.

HERBERT, V.; LAV, K. S.; GOTTLIER, C. W. & LEICHER, S. P. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal Clinical Endocrinology**., 25:1375 – 1384, 1965.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; IBEUNJO, C.; MARTYN, J.A.; IEBUNJO, C. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. **Metabolism**. Feb;50(2):216-22, 2001.

HUNTER, R.B.; STEVENSON, E.; KONCAREVIC, A.; MITCHELL-FELTON, H.; ESSIG, D.A.; KANDARIAN, S.C. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **FASEB J**. Apr;16(6):529-38, 2002.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, Jan;16(1):35-9, 1967.

LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal Applied Physiology**, Feb;28(2):234-6, 1970.

PERALES, M.A.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: the glucose-6-phosphatase riddle. **Mol Cell Biochem**. Feb 27;101(1):67-71, 1991.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J** :5291;1507 – 1513. 1962.

MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. **Gen Comp Endocrinol.** Jun;44:342-53, 1965.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory. National Academy Press, Washington, DC, USA.

NUNES, W.M.S.; MELLO, M.A.R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** (impress), 2005.

RADOSAVLJEVIC, T.; TODOROVIC, V.; SIKIC, B. Insulin secretion: mechanisms of regulation. **Med Pregl.** May-Jun;57(5-6):249-53 2004.

SCOTT, A.M.; 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,** Nov;21(5):470-5, 1981.

SINACORE, D.R.; GULVE, E.A. The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy. **Phys Ther.** Dec;73(12):878-91, 1993.

SJORGREEM, B.; NORDENSKJOLD, D.T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. Pfluger **Arch Gesante Physiol Menschen Tiere,** 240;247, 1938.

SUTTON, R.; PETERS, M.; MCSHANE, P.; GRAY, D.W.; MORRIS, P.J. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation**, Dec;42(6):689-91, 1986.

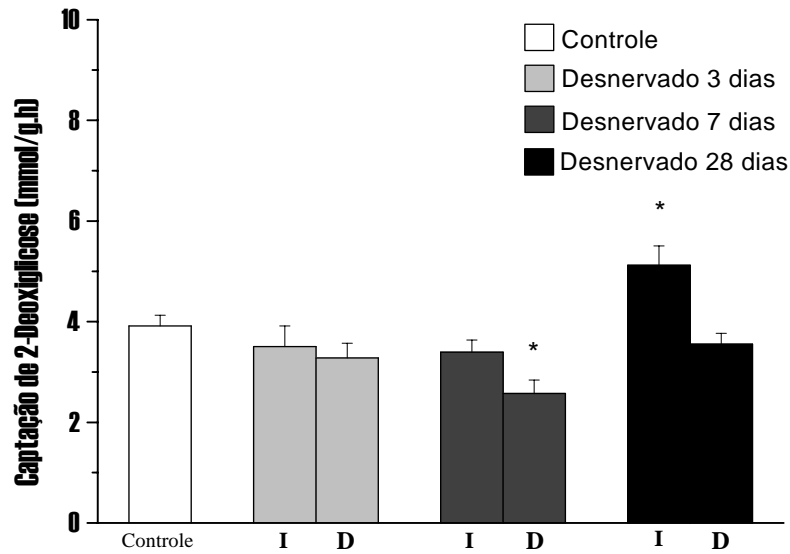
TURINSKY, J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal Physiology** 252:R531-7, 1987.

TURINSKY, J.& DAMRAU-ABNEY, A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. **American Journal Physiology**,275 (5pt2):R1425 – R1430, 1998.

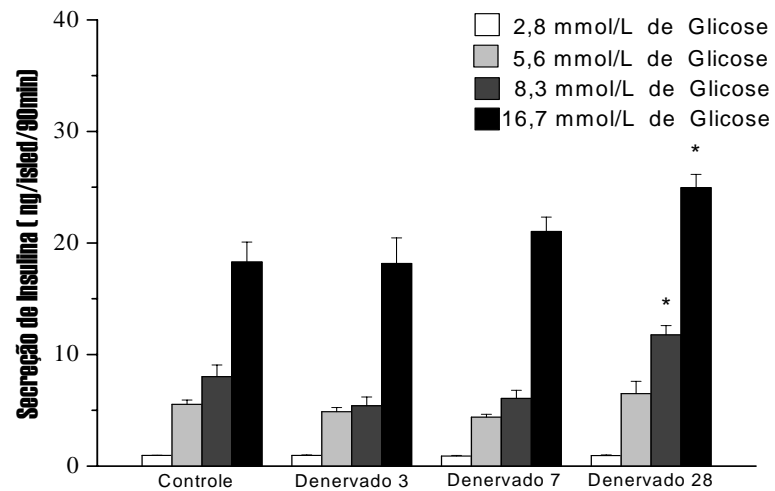
WALLBERG-HENRIKSSON, H. Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. **Acta Physiology Scand.** 131, Suppl. 564: 1-80, 1987.

WILKES, J.J; BONEN, A. Reduced insulin-stimulated glucose transport in denervated muscle is associated with impaired Akt-alpha activation. **Am J Physiol Endocrinol Metab** Oct;279(4):E912-9, 2000.

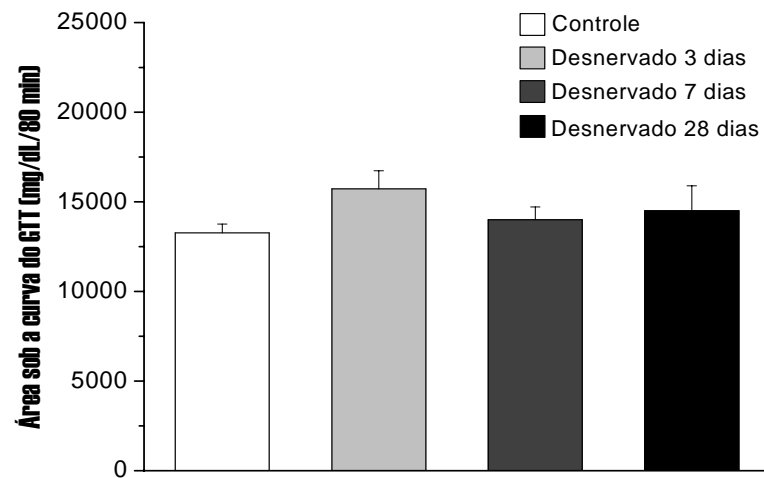
## 6.9.1 FIGURAS



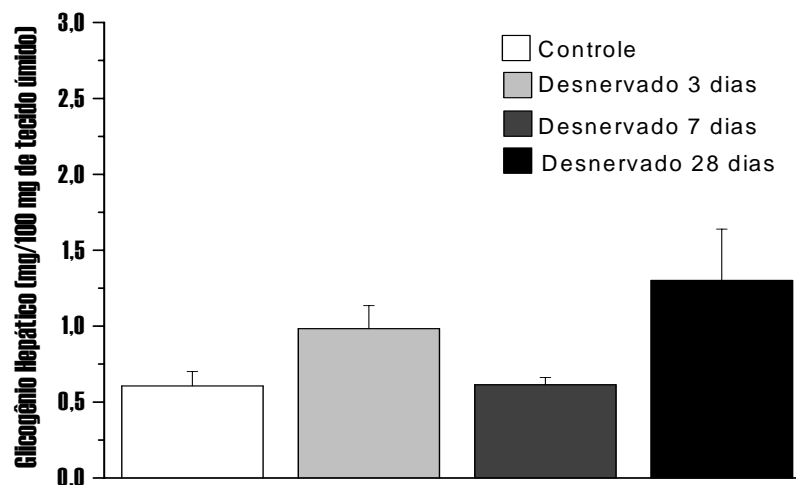
**Figura 1:** Captação de glicose pelo músculo sóleo isolado (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. O sinal (D) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal (I) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 7$  a 10 fatias musculares por grupo.



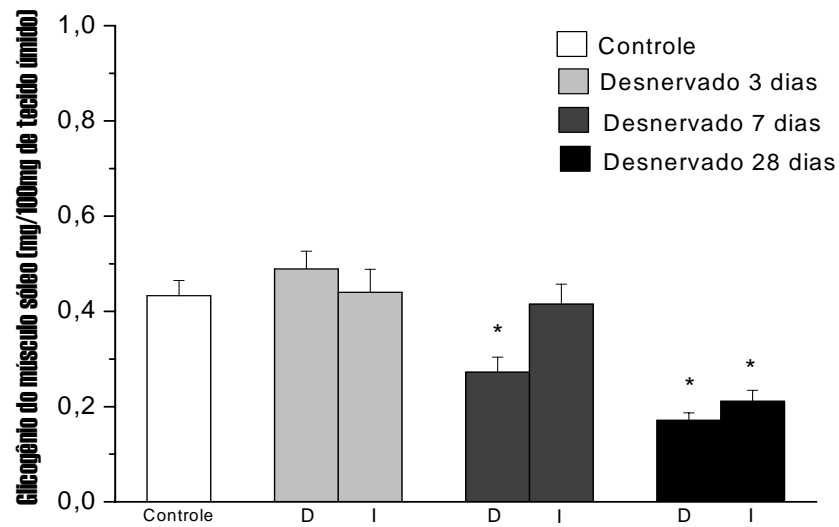
**Figura 2:** Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos e incubadas em presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,6 e 16,7 mmol/L) Controle refere-se ao animal íntegro. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 6$ .



**Figura 3:** Área sob a curva da glicose sérica durante o teste de tolerância à glicose. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 5$  a 10 ratos por grupo.



**Figura 4:** Teor de glicogênio hepático dos ratos (média  $\pm$  erro padrão) após 60 minutos da administração da Glicose (1mL/Kg), via intravenosa. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 5$  a 10 ratos por grupo.



**Figura 5:** Teor de glicogênio pelo músculo sóleo após GTT (média  $\pm$  erro padrão) de ratos. O sinal (D) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal (I) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 10$  a  $19$  fatias musculares.

## 7. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, verificamos que animais após 7 dias de desnervação, tiveram a captação de glicose diminuída pelo músculo sóleo da pata desnervada. Em contrapartida, a pata contralateral permaneceu com valores próximos aos da pata do animal controle, igualmente ocorrido com a pata desnervada após 28 dias. Por outro lado, a captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral desse mesmo grupo foi significativamente maior do que a pata do animal controle. Estudos demonstraram diminuição da captação de glicose na musculatura esquelética de ratos desnervado após 3 dias e 7 dias (TURINSKI, 1987; HIROSE et al., 2001; TURINSKY & DAMRAU-ABNEY, 1998). O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição na captação de glicose em músculos de patas desnervados por 3 e 7 dias está relacionado, em parte, à alteração dos mecanismos internos da cascata de reações químico-enzimáticas que culminam na translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (BERTELLI et al., 2003 e HIROSE et al., 2001). Davis & Karl (1988), verificaram em ratos que o transporte de glicose no músculo esquelético desnervado na presença de insulina reduzia-se entre o 3º e 7º dia de desnervação, aumentava após 7 dias e aumentava ainda mais ao 10º dia de desnervação. A redução no transporte da glicose em resposta à insulina entre o 3º e o 7º dia de desnervação sugere resistência à insulina no músculo

esquelético desnervado, com um retorno da resposta normal à insulina a partir do 10º dia desnervado (DAVIS & KARL, 1988).

A oxidação da glicose sofreu uma diminuição na pata do animal desnervado após 7 dias (figura 02, Cap I). Este dado sugere comprometimento da utilização da via glicolítica pela glicose. Parece haver recuperação da utilização desta via no músculo sóleo de animais desnervados após 10 dias (DAVIS & KARL, 1988). Esta informação foi confirmada no presente estudo, pois após 28 dias de desnervação, os valores referentes à oxidação da glicose no músculo sóleo foram normalizados.

Segundo Wallis et al. (1999), o declínio da atividade do glicogênio sintase ou fosforilase no músculo desnervado é um dos responsáveis pela atrofia. Esta atrofia ocorre em menor ou maior grau dependendo do tipo de fibra muscular em questão. Nossos dados referentes à síntese de glicogênio mostram que houve diminuição neste parâmetro tanto na pata desnervada quanto na contralateral 3 e 7 dias após a desnervação. Por outro lado, a síntese de glicogênio após 28 dias aumentou em relação ao controle.

Nossos resultados mostraram alteração no estoque de glicogênio no tecido hepático dos ratos submetidos a desnervação em relação aos controles após administração de insulina exógena. O aumento significativo do conteúdo de glicogênio hepático de ratos após 3 e 7 dias de desnervação em relação aos controles e após 28 dias de desnervação, sugere aumento na sensibilidade hepática ao hormônio nos ratos submetidos a desnervação. Este fenômeno parece relacionado à duração da desnervação. A taxa de remoção da glicose sanguínea após administração da insulina exógena foi significativamente maior nos ratos após 28 dias de desnervação em relação aos controles e aos valores observados após 3 e 7 dias de desnervação. O comportamento da

glicose circulante observado durante o teste de tolerância à insulina parece refletir adaptações em longo prazo do organismo como um todo à imobilização parcial imposta pela desnervação do músculo esquelético. O aumento observado na taxa de remoção da glicose sangüínea em resposta à insulina, após 28 dias de desnervação, provavelmente relaciona-se ao aumento da sensibilidade ao hormônio na musculatura íntegra, conforme sugerem os resultados à captação de glicose pelo músculo sóleo isolado da pata contralateral dos ratos submetidos a desnervação.

A contração e a insulina têm um efeito aditivo no transporte da glicose no músculo esquelético, sugerindo que os dois agem estimulando vias parcialmente independentes (IHLEMANN et al., 1999). O treinamento físico aumenta a expressão de Glut-4 na musculatura esquelética e melhora a tolerância à glicose e a ação da insulina no organismo como um todo (CHIBALIN, et al., 2000). Exercício tem múltiplos efeitos no metabolismo da glicose e na expressão gênica. No entanto, pouco se conhece sobre o mecanismo pelo qual a atividade física, aumenta a responsividade à insulina e ao transporte da glicose no músculo esquelético (CHIBALIN, et al., 2000). O exercício físico é um estímulo para a regulação de processos metabólicos e transcricionais na musculatura esquelética favorecendo tanto a captação de glicose quanto a síntese protéica que são fundamentais para a homeostase muscular (SAKAMOTO & GOODYEAR, 2002). Neste trabalho pudemos observar que o aumento da captação de glicose foi evidente no músculo sóleo de animais controle submetidos à natação e este aumento foi também verificado no músculo sóleo da pata contralateral e desnervada dos animais que foram submetidos ao exercício de natação. Estes dados sugerem que os mecanismos de sinalização interna da musculatura esquelética, que proporcionam a captação da glicose provavelmente são recuperados nos animais desnervados depois de

um período de 28 dias, e que o exercício físico tem um papel fundamental na melhora da captação da glicose no músculo sóleo. Isso provavelmente é devido ao aumento da sensibilidade à insulina proporcionada pela atividade física.

A regulação da captação da glicose na musculatura esquelética ocorre de várias maneiras, onde a insulina, a atividade metabólica do tecido e a atividade contrátil das fibras musculares são fundamentais. No músculo, a insulina promove a translocação de Glut-4 para a membrana celular, elevando a captação de glicose que pode ser oxidada ou direcionada para a formação dos estoques de glicogênio (KLIP & MARETTE, 1992). Por essa razão, foram analisadas a oxidação da glicose e a incorporação da glicose em glicogênio. A oxidação da glicose na musculatura esquelética foi aumentada nos animais submetidos ao exercício físico por natação tanto na pata contralateral quanto na pata desnervada. Igual fenômeno foi observado nas patas dos animais controles treinados. Estes dados estão de acordo com a literatura que indica melhoria do condicionamento aeróbio com o exercício moderado (MATZINGER et al., 2002). No entanto, não houve diferença na oxidação da glicose entre os animais controle e os animais desnervados após 28 dias mantidos sedentários. Por outro lado, a incorporação da glicose em glicogênio foi diminuída nos animais que foram submetidos à atividade física tanto no grupo controle quanto no grupo desnervado após 28 dias, em relação ao controle e ao grupo desnervado após 28 dias mantidos sedentários. Estes resultados demonstram a priorização da via glicolítica no exercício em detrimento a síntese de glicogênio.

Mudanças bioquímicas observadas na desnervação incluem variação na concentração e na atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na fosforilação. O aumento da concentração de AMPc, proteína quinase dependente de AMPc e da

atividade da adenilciclase são verificadas em músculo desnervado como também uma redução da atividade da glicogênio sintase e na glicogênio fosforilase (FROSTICK, 1995; WALLIS et al., 1999). Essas mudanças se iniciam após poucas horas de desnervação da musculatura esquelética e variam de acordo com o tipo de fibra muscular. No entanto, os resultados obtidos neste experimento nos animais sedentários com relação à oxidação e a incorporação da glicose em glicogênio demonstram que houve recuperação dos processos metabólicos que envolvem a glicose no desnervado crônico.

O músculo esquelético tem um papel essencial na manutenção da homeostase glicêmica (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987). No entanto, a variação das concentrações da glicose na corrente sanguínea é o fator mais importante na indução da secreção da insulina pela célula beta pancreática (HABER et al., 2001). A desnervação da musculatura esquelética altera a dinâmica de captação periférica da glicose podendo influenciar a concentração da glicose na corrente sanguínea e, com isso, afetar o processo secretório na célula beta pancreática.

Analizamos então a secreção da insulina de ilhotas de Langerhans isoladas dos grupos experimentais sob concentração crescente de glicose. O aumento de secreção de insulina no grupo desnervado após 28 dias nas concentrações 8,3 mM e 16,7mM, em relação ao grupo controle mostra um aumento de sensibilidade da ilhota a concentrações elevadas de glicose. A resistência à insulina observada em músculo desnervado desenvolve-se rapidamente pela diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina observado em poucas horas após ter sido desnervado (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987, WILKES, J., & BONEM A., 2000). No entanto, a expressão de GLUT-1 na membrana celular de animais submetidos a desnervação da

musculatura esquelética é aumentada. Este aumento ocorre devido à proteína quinase C a qual favorece o aumento da expressão do GLUT-1. O aumento de transportadores GLUT-1 na membrana da célula muscular, é uma importante tentativa de melhorar a captação da glicose e restabelecer a homeostase glicêmica. No entanto, esta tentativa de aumentar a captação da glicose pelo músculo através do GLUT-1 não é suficiente para restabelecer a homeostase glicêmica local ante a desnervação (HUNTER et al., 2002, BOSCH et al., 2003, GASTER et al., 2000).

A tentativa de restabelecimento da homeostase glicêmica parece ser complementada pelo aumento da resposta das células B à glicose, o que facilita a secreção do hormônio. Essa hipótese é confirmada pela resposta glicêmica dos animais ao teste de tolerância à glicose intravenosa, um vez que não houve diferença nos valores da área sob a curva de glicose sérica durante o GTTiv entre os grupos avaliados. Isso indica preservação da homeostase glicêmica.

## **8. CONCLUSÃO GERAL**

O conjunto dos resultados dos 3 estudos apresentados é indicativo de que a imobilização pela desnervação do músculo esquelético não somente provoca alterações metabólicas locais como pode interferir no metabolismo da glicose pelo organismo como um todo. Entre as alterações sistêmicas, houve aumento da resposta das ilhotas de Langerhans a concentrações elevadas de glicose. Essa alteração observada nas ilhotas pode ser útil na preservação da homeostase glicêmica.

Além disso, o exercício melhorou o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado assim como influenciou a resposta “in vivo” à insulina pelo animal. Desta forma, ratos submetidos à imobilização parcial por desnervação do músculo esquelético podem constituir um modelo útil ao estudo da homeostase glicêmica sob condição de imobilização.

## 9. REFERÊNCIAS GERAIS<sup>4</sup>

AHREN, B., LUNDQUIST, I. Effects of alpha-adrenoceptor blockade by phentolamine on basal and stimulated insulin secretion in the mouse. **Acta Physiol Scand.** Oct;125(2):211-7, 1985.

ANDERSEN, P.H.; LUND, S.; SCHMITZ, O.; JUNKER, S.; KAHN, B.B.; PETERSEN, O. Increased insulin-stimulated glucose up-take in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT protein and fiber type composition of skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand**, v.149, p393 - 404, 1993.

ARAUJO EP, AMARAL ME, SOUZA CT, BORDIN S, FERREIRA F, SAAD MJ, BOSCHERO AC, MAGALHAES EC, VELLOSO LA. Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. **FEBS Lett** 20;531(3):437-42, 2002.

ARMSTRONG, R.B. & PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat. **Am. J. Anat.** v.171, p259 - 272, 1984.

---

<sup>4</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – NBR 6023/2002

ASHCROFT, S.S.H. Glucoceptor mechanism and control of insulin release. **Diabetologia**, v. 18, p5-15, 1980.

ASHCROFT, F.M. Adenosine triphosphate sensitive K<sup>+</sup> channels. **An. Rev. Neurosci.**, v. 11, p97-118, 1988.

ASHCROFT, F.M., HARRISON, D.E., ASHCROFT, S.J.H.. Glucose induced closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta cell. **Nature**, v. 312, p 446-8, 1984.

BERTELLI, D.F.; UENO, M.; AMARAL, M.E.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; CARVALHO, C.R.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A. C. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, Apr;284(4):E679-87, 2003.

BEST, L.; MALAISSE, W.J.. Phospholipids and islets function. **Diabetologia**, v. 25, p299-305, 1983.

BEST, L.; MALAISSE, W.J. Nutrient and hormone-neurotransmitter stimuli induce hydrolysis of polyphosphoinositides in rat pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 115, p 1814, 1984.

BOOTH, F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **Journal. Applied. Physiology**, v.52: p1113 – 1118, 1982.

BOSCH, R.R.; BAZUINE, M.; WAKE, M.M.; SPAN, P.N.; OLTHAAR, A.J.; SCHURMANN, A.; MAASSEN, A.J.; HERMUS, A.D.R.M.M.; WILLEMS, P.H.G.M. AND SWEEP, C.G.J. Inhibition of Protein Kinase C $\beta$ II Increases Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes through Elevated Expression of Glucose Transporter 1 at the Plasma Membrane. **Molecular Endocrinology** 17(7): 1230 -1239. 2003.

BOSCHERO, A..C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. **Arq Brás Endocrinol Metabo** 40: 149 – 155, 1996.

BOSCHERO, A.C.; MALAISSE, W.J.. The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. The regulation of  $^{86}\text{Rb}$  efflux from perfused islets. **American Journal of Physiology**, v. 236, p139-46, 1979.

BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E.; SANTOS M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. **Hormone Metabolism Research**, Sep;13(9):531-2, 1981.

BRISSON GR, MALAISSE-LAGAE F, MALAISSE WJ. Effect of phentolamine upon insulin secretion during exercise. **Diabetologia**, Aug;7(4):223-6, 1971.

BURANT, C.F.; LEMMON S.K.; TREUTELAAR, M.K.; BUSE, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. **American Journal Physiology**, Nov;247(5 Pt 1):E657-66, 1984.

BURANT, C.F.; SIVITZ, W.I.; FUKUMOTO, H.; KAYANO, T.; NAGAMATSU, S. ; SEINO, S.; PESIN, J.E. & BELL, G.I. Mammalian glucose transporters: Structure and molecular regulation. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 47, p1-41, 1991.

BUSE, M.G.; BUSE, J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. **Diabetes** ; 8:218-25. 1959.

CARPINELLI, A.R., MACHADO, U.F., CURI, R.. Modulation of insulin secretion by feeding behavior and physical activity: possible beneficial effects on obese and aged rats. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 20, N2, P. 183-8, 1996.

CARPINELLI, A.R.; MALAISSE, W.J.. Regulation of  $^{86}\text{RB}^+$  outflow from pancreatic islets IV. Effects of cyclic AMP, dibutyryl-cyclic AMP and theophylline. **Acta Diabet. Lat.**, v.17, p199-205, 1980.

CHENG A, DUBE N, GU F, TREMBLAY ML. Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. **Eur J Biochem** Feb;269(4):1050-9, 2002.

CHIBALIN AV, 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**, v.4; 97(1):p38-43, 2000.

CODERRE, L.; MONFAR, M.M.; CHEN, K.S.; HEYDRICK, S.J.; KUROWSKI, T.G.; RUDERMAN, N.B. & PICH, P.F. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. **Endocrinology**, 131 (4): p1821-1825, 1992.

COX J.H., CORTRIGHT R.N., DOHM G.L., HOUMARD J.A. Effect of aging on response to exercise training in humans: skeletal muscle Glut-4 and insulin sensitivity. **Journal Applied Physiology**. v. 86:P2019 – 2025, 1999.

DAVIS, T. A. & KARL, I. E. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in desnervated muscle. **Biochemistry J**. 254, 667-675, 1988.

DAY, C.S.; RIANO, F.; TOMAINO, M.N.; BURANATANITKIT, B.; SOMOGYI, G.; SOTEREANOS, D. AND HUARD, J. Growth factor may decrease muscle atrophy secondary to denervation. **J. Reconstr. Microsurg.**, 1: 51-57, 2001.

DEVIS, G., SOMERS, G., MALAISSE, W. J.. Stimulation of insulin release by calcium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 67, p 525-9, 1994.

DOHERTY,R.O.;STEIN, D.;FOLEY, J. Insulin resistance. **Diabetologia**. New York 40:B10 – B15, 1997.

DOUEN AG, RAMLAL T, RASTOGI S, BILAN PJ, CARTEE GD, VRANIC M, HOLLOSZY JO, KLIP A. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. **J Biol Chem** 15;265(23):13427-30, 1990.

DUBOWITZ, V. & BROOKE, M.H. Muscle biopsy : a modern approach. London, Philadelphia, Saunders, p475, 1973.

DUTTARROY A, ZIMLIKI CL, GAUTAM D, CUI Y, MEARS D, WESS J. Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Diabetes** 53(7):1714-20, 2004.

ELMERNDORF, J.S.; DAMRAU-ABNEY, A.; SMITH, T.R.; DAVID, T.S.; TURINSKY, J. Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal of Physiology**. Bethesda Apr; 272(4 Pt 1):E661-70, 1997.

FADDA, G. Z., AKMAL, M., LIPSON, L. G., MASSRY, S. G. Direct effect of parathyroid hormone on insulin secretion from pancreatic islets. **American Journal of Physiology**, v. 258, pE975-E984, 1990.

FERRANDO A.A., LANE H.W.,STUART C.A., DAVIS-STREET J. AND WOLFE R.R.. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** V. 270: pE627 – E 633, 1996.

FROSTICK SP. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. **Int Angiol.** v.14(3):p278-87.1995.

FRANCH, J., ASLESEN, R., JENSEN, J. Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. **Biochemistry.** J.344, p231-235, 1999.

GASTER, M.; FRANCH, J.; STAEHR, P.; BECK-NIELSEN, H.; SMITH, T.; SCHRODER, H.D. Induction of GLUT-1 protein in adult human skeletal muscle fibers. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism.** 2000 Nov;279(5):E1191-5, 2000.

GEMBAL, M., GILON, P., HENQUIN, J.C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cell. **Journal Clinical Investigation,** v. 89, p1288-95, 1992.

GOODYEAR, L. J., HIRSHMAN, M.F., SMITH, R.J. & HORTON, E.S. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membrane of red and white skeletal muscle. **American Journal of Physiology,** v.261, pE556 - E561, 1991.

GOODYEAR, L. J., HIRSHMAN, M.F., VALYOU, P.M. & HORTON, E.S. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. **Diabetes**, v.41: p1091 - 1099, 1992.

GOODYEAR, L. J., KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Rev. Med.** (49): p235-261, 1998.

GRODSKY, G. M.; BENNETT, L. L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. **Diabetes**, v.15, p910, 1966

GOULD, G.W. & BELL, G.I. Facilitative glucose transporters: An expansive family. **Trends Biochem. Sci.** 15 (1), p18-23, 1990.

GUMÁ, A.; ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSSON AND KLIP, A. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism**, Bethesda, v.268, pE613 – E622, 1995.

GUYTON, A. C., HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2002.

HELLMAN, B., SEHLIN, J., TALJEDAL, I. B.. Calcium uptake by pancreatic B-cell as measured with the aid of <sup>45</sup>Ca and mannitol-3H. **American Journal of Physiology**, v. 221, p1795-1801, 1971.

HENRIKSEN, E.J., BOURNEY, R.E., RODNICK, K.J., KORANYI, L., PERMUTT, M.A. & HOLLOSZY, J.O. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**. v.259, pE593 - E598, 1990.

HENRIKSEN, E.J.; RODNICK, K.J. ; MONDON, C.E.; JAMES, D.E. & HOLLOSZY, J.O. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. **J. Appl. Physiol**. V.70, p2322-2327, 1991.

HENRIKSEN, E. J. AND SAENGSIRISUWAN, V. Exercise training and antioxidants: Relief from oxidative stress and insulin resistance. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v. 31,nº.2, p79 – 84. 2003.

HERBER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Secreção de Insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por Ácido graxos. **Arq Bras Endócrinol Metab** Vol 45 nº 3: 219 – 227, 2001.

HERBERT, V.; LAV, K. S.; GOTTLIER, C. W. & LEICHER, S. P. Coated charcoal immunoassay of insulin. **Journal Clinical Endocrinology.**, 25:1375 – 1384, 1965.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; IBEUNJO, C.; MARTYN, J.A.; IEBUNJO, C. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. **Metabolism**. Feb;50(2):216-22, 2001.

HOFMANN WW. Musculotrophic effects of insulin receptors before and after denervation. **Brain Res** Jan 20;401(2):312-21, 1987

HOELZER, D., DELASKY, G., CUTTER, W. Glucoregulation during exercise: hypoglycemia is prevented by redundant glucoregulatory systems: sympatochromafin activation and changes in hormonal secretion. **Journal Clinical. Investigation**, v. 77, p 212-21, 1986.

HOUMAD J.A., SHINEBARGER M. H., DOLAM P.L., LEGGETT-FRAZIER N., BRUNER R.K., MCCAMMON M.R., ISRAEL R.G., DOHM G.L.: Exercise training increase Glut-4 protein concentration I previously sedentary middled-aged men. **American Journal of Physiology**, v. 264: pE896 – E901, 1993.

HUNTER, R.B.; STEVENSON, E.; KONCAREVIC, A.; MITCHELL-FELTON, H.; ESSIG, D.A.; KANDARIAN, S.C. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **FASEB J.** Apr;16(6):529-38, 2002.

HAYASHI, T., WOJTASZEWSKI, J.F., AND GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 273: pE1039 – E 1051, 1997.

IHLEMANN, J., PLOUG, T., HELLSTEN, Y., GALBO, H. Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. **American Physiological Society**, pE208-E214, 1999.

JAMES, D.E.; JENKINS, A.B. & KRAEGEN, E.W. Heterogeneity of insulin action in individual muscle “in vivo”. **American Journal of Physiology**, v.248, pE567 - E 574, 1985.

JARVINEN TA, JARVINEN TL, KAARIAINEN M, KALIMO H, JARVINEN M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Méd** May;33(5):745-64, 2005.

KASUGA M, KARLSSON FA, KAHN CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science** Jan 8;215(4529):185-7, 1982.

KELLEY, D. E.; REILLY, J.P. & VENEMAN,T. Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. **American Journal of Physiology**, v.258, pE923 - E929, 1990.

KERN, M.J., WELLS, J.A., STEPHENS, J.M. ELTON, C.W., FRIEDMAN, J. TAPSCOTT, E.B., PEKATA, P.H. & DOHN, G.L. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT 4) protein level. **Biochem. J.** 270, p397 - 400, 1990.

KIM, Y., INOUE, T.NAKAJIMA, R. NAKAE K.,TAMURA T. TOKUYAMA K. AND SUZUKI M.. Effects of endurance training on gene expression of insulin signal transduction pathway. **Biochem.. Biophys. Res.** v. 210: p766 – 773. 1995.

KLIP A, MARETTE A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. **J Cell Biochem**; v. 48(1): p51-60, 1992.

KLIP, A. & PAQUET, M. R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. **Diabetes Care**. 13, p228 - 243, 1990.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, Jan;16(1):35-9, 1967.

LIN Y, BRADY MJ, WOLANSKE K, HOLBERT R, RUDERMAN NB, YANEY GC. Alterations of nPKC distribution, but normal Akt/PKB activation in denervated rat soleus muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** Aug;283(2):E318-25, 2002.

LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal Applied Physiology**, Feb;28(2):234-6, 1970.

LOUBATIERES, A., MARIANI, M.M., CHAPAL, J.; Role of alpha and beta adrenergic receptors in insulin secretion. **Diabete**, Jan-Mar;18(1):17-20,1970.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**. Jun 2; 5291: p1507-13, 1962.

MAGNUSSON C, SVENSSON A, CHRISTERSON U, TAGERUD S. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. **Eur J Neurosci.** 2005 Jan;21(2):577-80, 2005.

MAKINO H, MANGANIELLO VC, KONO T. Roles of ATP in insulin actions. **Annu Rev Physiol** 56:273-95, 1994.

MALAISSÉ , W.J. MALAISSÉ-LAGAE, F., WRIGHT, P.H.. Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 13, n. 4, p843-8, 1967.

MATHIAS, C.P.F., CARPINELLI, A.R., BILLAUDEL, B., GARCIA-MORALES, P., VALVERDE, I., MALAISSÉ, W.J. Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. **Pharmacol.**, v. 34, n. 19, p. 3451-7, 1985.

MATHIAS, C.P.F., SALVATO, E.M., CURI, R., MALAISSÉ, W.J. CARPINELLI, A.R.. Effect of epinefrine on  $^{86}\text{Rb}$  efflux,  $^{45}\text{Ca}$  outflow and insulin release from pancreatic islets perfused in the presence of propranolol. **Horm. Metabol. Res.**,v. 25, p138-41, 1993.

MATZINGER O, SCHNEITER P, TAPPY L. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 282(1): pE125-31, 2002.

MCDERMOTT JC, ELDER GC, BONEN A. Non-exercising muscle metabolism during exercise. **Pflugers Arch** May;418(4):301-7, 1991.

MEGENEY, L.A. , ELDER, G.C.B., TAN, M.H., & BONEN, A. Increased glucose transport in non-exercising muscle. **American Journal of Physiology** v.262: pE20 - E26, 1992.

MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. **Gen Comp Endocrinol.** Jun;44:342-53, 1965.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the Care and Use of Laboratory. **National Academy Press**, Washington, DC, USA. 1996.

NESHER, R. KARL, I. E., & KPNIS, D.M. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. **American Journal of Physiology**, v. 249 : pC226 - C232,1985.

NEUFER, P.D., SHINEBARGER, M.H., & DOHN, G.L. Effect of training and detraining on skeletal muscle glucose transporter (GLUT 4) content in rats. **Can. j. Physiol. Pharmacol.** v.70: p1286 - 1290, 1992.

NUNES, W.M.S.; MELLO, M.A.R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** (impress), 2005.

PAASSEN-IJKEMA, J.; MEEK, M.F. AND GRAMSBERGEN, A. Reinnervation of muscle after transection of sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*, v. 6: p891 – 897, 2002.

PESSIN JE, BELL GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 54:911-30, 1992.

PESSIN JE, GITOMER W, OKA Y, OPPENHEIMER CL, CZECH MP. beta-Adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1983 Jun 25;258(12):7386-94, 1983.

PERALES, M.A.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: the glucose-6-phosphatase riddle. *Mol Cell Biochem*. Feb 27;101(1):67-71, 1991.

PLOUG, T., GALBO, H., VINTEN, J. JORGENSEN, M. & RICHTER, E.A. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *American Journal Physiology*, v.253: pE12 - E 20, 1987.

PLOUG T., OHKUWA T., HANDBERG A., VISSING J., AND GALBO H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 268: pE980 – E986, 1995.

RADOSAVLJEVIC, T.; TODOROVIC, V.; SIKIC, B. Insulin secretion: mechanisms of regulation. **Med Pregl.** May-Jun;57(5-6):249-53 2004.

RICHARDSON, J.M., BALON, T.W., TREADWAY, J.L. & PESSIN, J.E. Differential regulation of glucose transport activity and expression in red and white skeletal muscle. **Journal Biological Chemistry.** V.266: p12690 - 12694, 1991.

RODNICK, K.J., HENRIKSEN, E.J., JAMES, D.E. & HOLLOSZY, J. O. Exercise training, glucose transporters and glucose transport in rat skeletal muscles. **American Journal Physiology,** v.262, pC9 - C14, 1992.

ROY, D., JÓHANNSSON, E., BONEN, A., MARETTE, A. Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT 4 to T tubules in skeletal muscle. **American Physiological Society.** pE688-E694, 1997.

RYDER, J.W., KAWANO, Y., GALUSKA, D., FAHLMAN, R., HENRIKSSON, H.W., CHARRON, M.J., ZIERATH, J.R. Post exercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4 – deficient mice. **The FASEB Journal.** v.13: p2246-2256, 1999.

SAAD, M. J. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** Ribeirão Preto v.27(4): p941 – 957, 1994.

SAKAMOTO K, GOODYEAR LJ. Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**. Jul; v.93(1):p369-83. 2002.

SALTIEL, A.R, KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature** Dec 13;414(6865):799-806, 2001.

SARABIA, V.; LAM, L.; BURDETT, E.; LAITER, L.A.; KLIP, A. Glucose transport in human skeletal muscle cell in culture. **Journal Clinical Investigation**, v.90: 1386-1395, 1992.

SCOTT, A.M.; 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**, Nov;21(5):470-5, 1981.

SHANGRAW R.E., STUART C.A., PRINCE M.J., PETERS E.J., AND WOLFE R.R. Insulin responsiveness of protein metabolism in vivo following bed rest in humans. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.255: pE548 – E558, 1988.

SHILO, M., SOTOSKI, M., SHAMOON, H. Islet hormonal regulation of glucose turnover during type I diabetes. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 70, p. 162-72, 1990.

SINACORE, D.R.; GULVE, E.A. The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy. **Phys Ther.** Dec;73(12):878-91, 1993.

SMITH, R.L. & LAWRENCE, J.C. Insulin action in denervated rat hemidiaphragms. **Journal Biol. Chem.** v. 259: p2201-2207, 1984.

SMITH, R.L.; RACH, P.J.; LAWRENCE, J.C. (1988), Insulin resistance in denervated skeletal muscle. **Journal Biological Chemistry**, 263: p658 – 665, 1988.

SMUTOK M.A., REECE C., KOKKINOS P.F., FARMER C.M., DAWSON P.K., DEVANE J., PATTERSON J., GOLDBERG A.P., HURLEY B.F.: Effects of exercise training modality on glucose tolerance in men with abnormal glucose regulation. **Int. J. Sports Med.**, v. 15, No. 6, p283 – 289, 1994.

SOWELL, M. O.; DUTTON, S.L.; BUSE, M.G. Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bethesda, 257:E418 –E425, 1989.

SJORGREEM, B.; NORDENSKJOLD, D.T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Beitrag zur Kenntnis des le berrhythmik. **Pfluger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere**, 240;247, 1938.

STE MARIE L, PALMITER RD. Norepinephrine and epinephrine-deficient mice are hyperinsulinemic and have lower blood glucose. **Endocrinology** Oct;144(10):4427-32. Epub 2003 Jun 26, 2003.

STEIN T.P., SCHULTER M.D. AND BODEN G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. **Aviat Space Environ. Med.** 65: p1091 – 1096, 1994.

STRAUB SG, SHARP GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes Metab Res Rev** Nov-Dec;18(6):451-63,2002.

STUART C.A., SHANGRAW R.E., PRINCE M.J., PETERS E.J. AND WOLFE R.R. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. **Metabolism**, v. 37: p802 – 806, 1988.

SUAREZ E, BACH D, CADEFAU J, PALACIN M, ZORZANO A, GUMA A. A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. **J Biol Chem** May 25;276(21):18257-64,2001.

SUTTON, R.; PETERS, M.; MCSHANE, P.; GRAY, D.W.; MORRIS, P.J. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation**, Dec;42(6):689-91, 1986.

TAMAGAWA, T., HENQUIN, J.C. Chloride modulation of insulin release,  $^{86}\text{Rb}^+$  efflux, and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fluxes in rat islets stimulated by various secretagogues. **Diabetes**. May;32(5):416-23, 1983.

TARASOV A, DUSONCHET J, ASHCROFT F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel: a pas de deux. **Diabetes** Dec;53 Suppl 3:S113-22, 2004.

TAYLOR, R. Insulin action. **Clinical Endocrinology**. v.34: p159 – 171, 1991.

TURINSKY, J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. **American Journal Physiology** ;252:R531-7, 1987.

TURINSKY, J.& DAMRAU-ABNEY, A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. **American Journal Physiology**,275 (5pt2):R1425 – R1430, 1998.

VALVERDE, I., VANDERSMEERS, A., ANJANEYULU, R., MALAISSE, W.J.. Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets. **Science**, v. 206, p 225-7, 1979.

WALLBERG-HENRIKSSON, H. Glucose transport into skeletal muscle: influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** 564: p1 - 80, 1987.

WALLIS, M.G.; APPLEBY, G.J.; YOUNG, J.M.; CLARK, M.G.; PENSCHOW, J.D.

Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated Hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. **Live Sciences**, Vol. 64, (4), p221-228, 1999.

WHITE MF, KAHN CR. Cascade of autophosphorylation in the beta-subunit of the insulin receptor. **J Cell Biochem** Apr;39(4):429-41, 1989.

WILKES, J.J; BONEN, A. Reduced insulin-stimulated glucose transport in denervated muscle is associated with impaired Akt- $\alpha$  activation. **Am J Physiol Endocrinol Metab** Oct;279(4):E912-9, 2000.

WRIGHT, P.H.; MALAISSE, W.J. Effect of epinephrine, stress and exercise on insulin secretion by the rat. **American Journal of Physiology**., v. 214, p. 1031-4, 1968

ZAWALICH, W.S., KARL, R.C., MATSCHINSKY, F.M. Effects of alloxan on glucose-stimulated insulin secretion, glucose metabolism, and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in rat isolated islets of langerhans. **Diabetologia** Feb;16(2):115-20, 1979.

ZICK Y. The insulin receptor: structure and function. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 24(3):217-69, 1989.

## **10. ABSTRACT**

This study aimed to analyze the metabolism of glucose in the soleus muscle of rats submitted to denervation, as well as the response of the animal as a whole to exogenous insulin and to exercise. To do this, 3 experiments were carried out. In the first, adult rats (3 to 5 months old) were submitted to section of the sciatic nerve in the right paw. A reduction was observed in the uptake of glucose by the isolated soleum muscle of the denervated paw after 3 and 7 days, but not after 28 days in relation to the whole control animals. There was no difference after 3 and 7 days in glucose uptake by the soleum muscle of the opposite paw in relation to the control animal. There was increased glucose uptake in this same paw 28 days after denervation. The rate of glucose removal in response to exogenous insulin after 28 days of denervation was higher than that of whole control animals and those observed after 3 and 7 days of denervation. In the second experiment, rats in the same conditions, after 48 h of denervation started a swimming program 1h/day, 5day/week, for 28 days. The denerved rats submitted to exercise showed a higher blood glucose removal rate in response to exogenous insulin compared to the sedentary and whole control animals. Exercise raised the uptake and oxidation of glucose by the opposite muscle and by the denervated one, as well as by the muscles of the whole control animals. These results suggest that restricted alterations of the muscular glucose metabolism influenced the glycemic homeostasis of

the animal. Furthermore, exercise improved the uptake and use of glucose in the denervated muscle. In the third experiment, adult rats in the same conditions as in the first study, had an assessment made of their insulin secretion by isolated pancreatic islets, incubated in the presence of growing concentrations of glucose (2.8; 5.6; 8.3 and 16.7 mM). There was an increase in insulin secretion at the glucose concentrations of 8.3 and 16.7. mM after 28 days of denervation, in relation to the same concentrations of the whole control group. These results indicate an increase in the sensitivity of the islet with high glucose concentrations, which may be useful in the presence of glycemic homeostasis. The set of results of the 3 studies suggest that immobilization by denervation interferes not only in the metabolism of glucose in the denervated skeletal muscle but also in other tissues. The mechanisms of this interaction still require further investigation.

**Key Words:** Denervation, Glycidic Metabolism and Skeletal Muscle

## *APÊNDICE 1*

Nunes, WMS, Mello MAR. Glucose Metabolism in Rats Submitted to Skeletal Muscle Denervation.

Brazilian Archives of Biology and Technology.

(Accepted for publication)

## GLUCOSE METABOLISM IN RATS SUBMITTED TO SKELETAL MUSCLE DENERVATION

Wilton Marlindo Santana Nunes\* and Maria Alice Rostom de Mello.

Department of Physical Education, Bioscience Institute, State Paulista University – UNESP(“Universidade Estadual Paulista”) Rio Claro - SP, Brazil

### ABSTRACT

*This study analyzed the local and systemic effects of immobilization by denervation of the skeletal muscle on glucose metabolism. The rats were submitted to section of the right paw sciatic nerve. A reduction was observed in glucose uptake by the isolated soleus muscle of the denervated paw after 3 and 7 days, but not after 28 days in relation to the control animals. There was no difference after 3 and 7 days in glucose uptake by the soleus muscle of the opposite intact paw in relation to the control. There was increased glucose uptake in the same paw 28 days after denervation. The rate of glucose removal in response to exogenous insulin after 28 days of denervation was significantly higher than in control animals and those observed after 3 and 7 days of denervation. These results suggest that immobilization by denervation interferes not only in glucose metabolism in the skeletal muscle involved but also in other tissues.*

**Key Words:** Denervation, Glucose metabolism, Skeletal muscle.

### INTRODUCTION

It is known that glucose is an important energy substrate for the organism and therefore, its utilization has been exhaustively studied in various physiological and pathological situations. Peripheral insulin resistance is characterized mainly by the decreased glucose uptake by the skeletal muscle (Doherty et al., 1997). The decrease in glucose uptake is associated with failures both in the hormone coupling mechanism to its specific receptor and in the post-receptor events (Saad, 1994). Many efforts have been dedicated to understand the mechanisms of insulin action since its discovery in 1921. In the search for understanding the processes that lead to insulin resistance, various models have been proposed over the last few decades, among these, denervation of the skeletal muscle. The exact intracellular signaling mechanism, which is mediated by the insulin receptor and results in various biological responses, was partially

elucidated in the denervation model (Bertelli et al., 2003). It is known that the immobilization of skeletal muscle by denervation causes several local alterations, in which glucose uptake and glycogen synthesis are diminished (Smith et al., 1988, Lin et al., 2002) as well as sensitivity to insulin (Sowell et al., 1989). There is a reduction in the activity of the regulatory pathways of glucose metabolism and genic expression of the glucose transporters (Elmerndorf et al., 1997), associated with the process of atrophy (Coderre et al., 1992; Henriksen et al., 1991). In the skeletal muscle, glucose transport is mediated by the glucose transporter protein GLUT-4. Insulin increases glucose transport by the translocation of GLUT-4 molecules coming from intracellular deposits to the plasma membrane (Gumá et al., 1995). According to Turinsky, 1987, the effect of denervation on the muscle metabolism is influenced by the population of muscle fibers.

---

\* Author for correspondence

The metabolic disorder caused by the denervation starts between 3 and 6 hours after section of the nerve. As the signs of resistance to insulin occur only in the denervated musculature, the opposite paw muscle is used as control in the skeletal muscle denervation model. (Hofmann, 1987). Since the first demonstration that the interruption of the nerve that supplies the muscle results in insulin resistance (Buse and Buse, 1959), denervation has been used as tissue specific model of insulin resistance (Day et al., 2001, Paassen-Ijkema et al., 2002, Bertelli et al., 2003). On the other hand, few studies address the effects of the muscular alterations arising from immobilization by denervation on the maintenance of glucose homeostasis by the organism as a whole. Skeletal muscle and adipose tissue are the two main sites of hypoglycemic action of insulin and together compose almost 65% of the body weight (Guyton and Hall, 2000). Thus, any alteration in sensitivity and/or responsiveness of these tissues to the hormone may impair glucose homeostasis. Therefore, this study analyzes the local and systemic effects of immobilization by denervation of the skeletal muscle on the glucose metabolism of rats, to verify if the model is adequate to studies on glucose homeostasis under condition of partial immobilization.

## MATERIALS AND METHODS

Male wistar albino rats aged from 3 to 5 months supplied by the UNESP experimental animal facilities were used in the present experiment. The animals had free access to food (Purina for rodents) and water, being submitted to a photoperiodic light/dark cycle of 12 h at a temperature of 25°C. For denervation, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital, (Thiopental, ABBOTT, SP), at a concentration of 50 mg/K of body weight, and tricotomized in the posterior portion of the thighs from which a portion of the sciatic nerve from the right paw was sectioned and removed, according to the denervation model proposed by Coderre et al., 1992. For the experiments, the animals were divided into 4 groups: 1)Control: intact

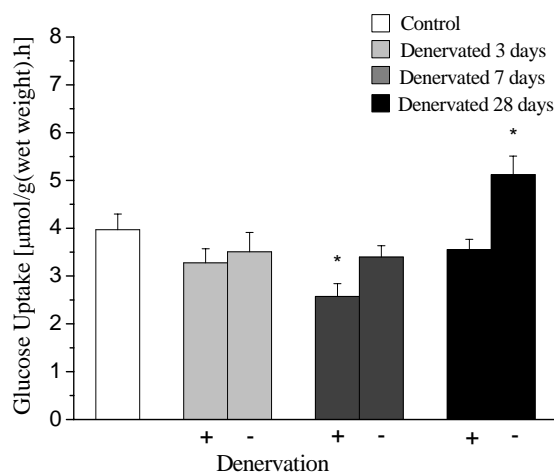
animals; 2)Denervated 3 days: analyzed 3 days after denervation; 3)Denervated 7 days: analyzed 7 days after denervation; 4)Denervated 28 days: analyzed 28 days after denervation. In a first series of experiments, glucose metabolism in the isolated soleus muscle was checked after sacrificing the animals by decapitation. The muscle was isolated with the minimum possible lesion and longitudinal strips weighing 25 – 35 mg (wet weight) were first incubated for 30 min at 37°C in a Dubinoff water bath (FANEN, MODEL 145), inside glass scintillation vials containing 1.5 mL of a Krebs bicarbonate buffer (NaCl 0.6%; HEPES 6.64 mM; KCl 0.032%; CaCl<sub>2</sub> 1.14mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.015%; NaHCO<sub>3</sub> 0.19%; MgSO<sub>4</sub> 0.03%) equilibrated with a mixture of 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>, pH 7.4. After this time, the muscle strips were transferred to new glass scintillation vials (outer vials) containing 1.5 mL of Krebs-bicarbonate buffer supplemented with glucose 5.5 mM, containing [U-<sup>14</sup>C]glucose (0.25 mCi/mL) and [3H+] 2-deoxyglucose (2DG, 0.5 µCi/mL) and insulin (100 µU/mL). Inside these scintillation vials, other glass vials (inner vials), which are formed like a scoop with an upwards-directed straight shaft, containing 700µL of hyamine 10-x were installed. The shafts of the inner vials were squeezed about 1 cm through a small hole in a round rubber membrane. The outer vials were sealed with the rubber membrane and lacked with plastic rings. This system, containing the muscle strips, was incubated in the dubinoff water bath for 60 min. The release of CO<sub>2</sub> was stimulated by the injection of 200 µL of trichloroacetic acid (TCA) 25% into the outer vials and the CO<sub>2</sub> was trapped in hyamine 10-x during a further 3 h incubated at 37°C. Lactate production was determined by measuring the radioactivity of the <sup>14</sup>C in the outer vial incubation medium after separation of the substrate using Dowex-2 ion exchange columns. Glucose incorporation to glycogen (glycogen synthesis) was determined by measuring the radioactivity of the <sup>14</sup>C in the precipitated obtained during muscle glycogen extraction process (Sjorgreen et al., 1938). Glucose oxidation was estimated by the measurement of the radioactivity of the <sup>14</sup>C in the inner vial liquid. Glucose (2DG) uptake

was evaluated in the alkaline phase obtained during muscle glycogen extraction process, by measuring the radioactivity of the  $^3\text{H}^+$ . All measurement of radioactivity were made in a PACKARD Tricarb 2100 scintillation counter, in a TRITON X-100 toluene-based scintillant (Silva et. al., 2000). Intravenous insulin tolerance test (ittiv) was carried out in a second series of experiments. Animals from all the groups received insulin (mixed regular purified), injected in the penial vein at the concentration of 1UI/mL in the dose of 1UI/Kg of body weight. Blood samples (100  $\mu\text{L}$ ) were collected from the femoral vein in 1 mL syringes before (time 0) and after 2:30, 5:00, 10:00, and 20:00 (min) of the administration of insulin, for serum glucose determination. The glucose removal rate (Kitt), during the insulin tolerance test was calculated according to Lundbaek, 1962, using the computer program ORIGIN® 6.0. After 60 min, of insulin infusion for the ittiv, the rats were sacrificed by decapitation for the removal of liver fragments, to analyze the effects of the administration of exogenous insulin on the glycogen contents (Lo et al., 1970). Statistical analysis of the data was done by the analysis of variance followed by the Tukey test, wherever appropriate. In all the cases, the critical level of 5% ( $p < 0.05$ ) was fixed.

## RESULTS

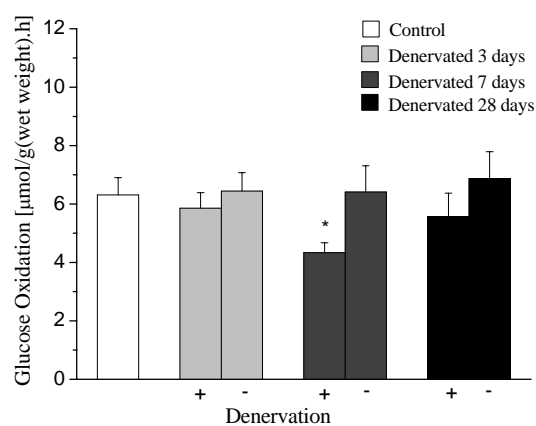
In the first series of experiments, a significant reduction was observed in glucose uptake by the soleus muscle of the denervated paw after 7 days, in relation to the control group (Figure 1). On the other hand, there were no significant differences in the denervated paw after 3 and 28 days in relation to the control group. Glucose uptake was also assessed in the soleus muscle of the opposite paw in control and denervated animals groups after 3, 7 and 28 days. The results showed that there was no alteration in the intact opposite paw of the denervated animals after 3 and 7 days. On the other hand, a significant increase was observed in glucose uptake by the soleus muscle of the opposite paw of the denervated animal after 28 days, in relation to the control

animal (Figure 1). In addition, glucose oxidation and glycogen synthesis by the isolated soleus muscle were analyzed. There was no difference in glucose oxidation between the animals denervated



**Figure 1** - Glucose uptake by the soleus muscle (mean  $\pm$  standard error) for rats in all groups. The (+) sign refers to the denervated paw, while the (-) sign refers to the opposite paw of the same animals. Control refers to intact animals. (\*) Significant difference,  $P < 0.05$  in relation to control group.  $n = 7$  to 10 muscle strips per group.

paws after 3 and 28 days, and neither in the opposite soleus of denervated animals after 3, 7 and 28 days in relation to the control animal. On the other hand, glucose oxidation diminished in the denervated paw after 7 days (Figure 2).

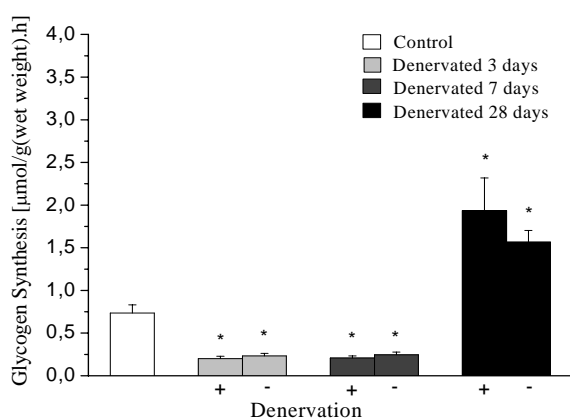


**Figure 2** - Glucose oxidation by the soleus muscle (mean  $\pm$  standard deviation) in rats of all groups. The (+) sign refers to the denervated paw while the (-) sign refers to the opposite paw of the same animals. Control refers to intact animals. (\*)

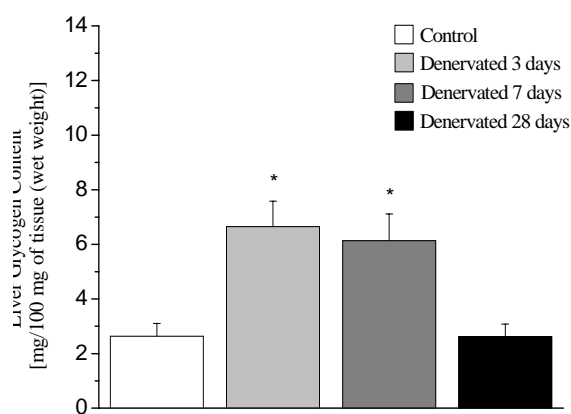
Significant difference,  $P < 0.05$  in relation to the control group.  $n = 8$  to 10 muscle strips.

With regard to glycogen synthesis, there was a decrease in the animals' denervated and opposite paws after 3 and 7 days, and increase in the animals' denervated and opposite paws after 28 days in relation

to the control rat (Figure 3).

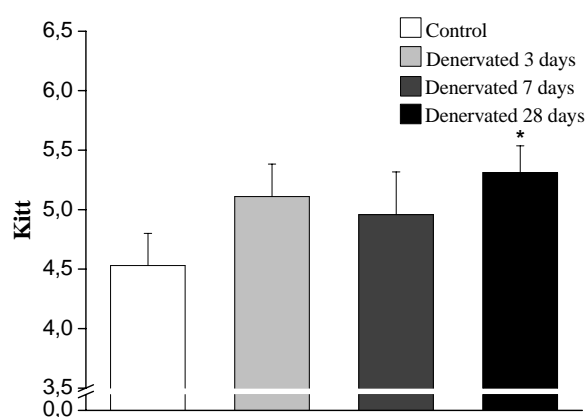


**Figure 3** - Glycogen synthesis by the soleus muscle (mean  $\pm$  standard error) in rats of all groups. The (+) sign refers to the denervated paw while the (-) sign refers to the opposite paw of the same animals. Control refers to intact animals. (\*) Significant difference,  $P < 0.05$  in relation to the control group.  $n = 10$  to 13 muscle strips.



**Figure 4** - Liver glycogen content (mean  $\pm$  standard error) after 60 minutes of insulin (1UI/Kg). Administration intravenously to animals of all the groups. Control refers to intact animals. (\*) Significant difference,  $P < 0.05$  in relation to the control rat.  $n = 5$  to 10 rats per group.

In the second series of experiments, the rate of blood glucose removal (Kitt) was assessed in rats submitted to an intravenous insulin tolerance test (ittiv). The results obtained are described in Figure 5. The animals Kitt values after 28 days of denervation were significantly higher than those of the control animals and those after 3 and 7 days of denervation (Figure 5). The liver is exceptionally important in glucose metabolism, and for this reason, liver glycogen contents were checked after the intravenous insulin tolerance test, with the aim of assessing the effects of exogenous insulin.



**Figure 5** - Blood glucose removal rate (Kitt), during tolerance to insulin test (mean  $\pm$  standard error) in rats of all the groups. Control refers to whole animals. (\*) Significant difference,  $P < 0.05$  in relation to the control rat.  $n = 8$  to 10 animals per group.

The results showed an increase in the denervated animals liver glycogen stocks after 3 and 7 days in relation to the control animals. However, there was no alteration in these contents in animals after 28 days of denervation (Figure 4).

## DISCUSSION

In this study, it was found that glucose uptake by the soleus muscle, induced by insulin, underwent variation among the groups. After 7 days of denervation, the animals had diminished glucose uptake by the soleus muscle of the denervated paw. On the other hand, the opposite paw continued to show

values close to those of the control animal. This reduction in glucose uptake by skeletal muscle after 7 days of denervation is reported in the literature. Studies have shown decreased glucose uptake in the denervated skeletal muscle of rats after 3 days and 7 days (Turinsky, 1987, Hirose et al., 2001, Turinsky & Damrau-Abney, 1998). The mechanism by which the reduction in glucose uptake occurs in denervated muscle for 3 and 7 days is partly related to the alteration of the internal chemical-enzymatic cascade reaction mechanisms, which culminate in the translocation of the glucose transporter to the plasma membrane (Bertelli et al., 2003 e Hirose et al., 2001). There was no alteration in the glucose uptake by the soleus muscle of the denervated paw after 28 days. On the other hand, glucose uptake by the soleus muscle of the opposite paw of this same group was significantly higher than that of the intact control group. Davis & Karl, 1988, found that glucose transport in the rat denervated skeletal muscle in the presence of insulin is reduced between the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of denervation, increased after 7 days and increased even more on the 10<sup>th</sup> day of denervation. The reduction in glucose transport in response to insulin between the 3<sup>rd</sup> and the 7<sup>th</sup> day of denervation suggests resistance to insulin in the denervated skeletal muscle, with a return of the normal response to insulin from the 10<sup>th</sup> day on (Davis & Karl, 1988). Denervation inhibits multiple aspects of glucose metabolism in the skeletal muscle, apart from the uptake, among them: incorporation of the glucose in glycogen, glucose-6-phosphate content and activity of the glucogen synthase enzyme (Burant et al., 1984). These changes have been attributed to the losses of the trophic factor derived from the nerve and/or the electrical stimulation by the nerve (Davis & Karl, 1988). Glucose oxidation was diminished in the animal's denervated paw after 7 days (Figure 2). This datum suggests that the use of the glycolitic path by glucose was affected. There is a recovery of the use of this path in the soleus muscle of denervated animals after 10 days (Davis & Karl, 1988). This latter information was confirmed in this study, because after 28 days of denervation, the values of glucose oxidation by the soleus muscle returned to

normal. Muscle atrophy is generally evident after the 3<sup>rd</sup> day of denervation and considerably greater on the 7<sup>th</sup> day of denervation. According to Wallis et al., 1999, the decline in glycogen synthetase or phosphorilase activity in the denervated muscle is among the factors responsible for the atrophy. This atrophy occurs to a greater or lesser extent depending on the type of muscle fiber. The data in this study with reference to glycogen synthesis, show that there was a decrease in this parameter both in the denervated paw and the opposite 3 and 7 days after denervation. On the other hand, glycogen synthesis after 28 days increased in relation to the control. In summary, the results of this study, with reference to glucose metabolism in the denervated skeletal muscle, confirm and broaden information already described in the literature. Once the suitability of the model had been established, one proceeded with analyzing the effect of denervation of the skeletal muscle on the animal's glucose homeostasis. To do this, blood glucose removal rate (Kitt) as well as liver glycogen contents after "*in vivo*" administration of exogenous insulin were evaluated. The results of this set of experiments showed alteration in the liver glycogen stock of the rats submitted to denervation in relation to the controls after exogenous insulin administration. The significant increase in the liver glycogen content of rats after 3 and 7 days of denervation in relation to the controls and the decrease after 28 days of denervation, suggest an alteration in liver sensitivity to the hormone in the rats submitted to denervation. Taken together, the results obtained in the soleus muscle and in the liver suggest an intricated metabolic association between liver glycogen content after 3, 7 and 28 days and muscle glucose uptake and glycogen synthesis rates. The higher the liver glycogen stores, the lower the muscle glucose uptake and glycogen synthesis rates, as occurred after 3 and 7 days after denervation. The opposite phenomenon was observed 28 days after denervation. Further investigation is required on the basis for this metabolic association. The blood glucose removal rate (Kitt) in response to exogenous insulin administration was significantly higher in the

rats after 28 days of denervation in relation to the controls and to the values observed after 3 and 7 days of denervation. Circulating glucose profile observed during the insulin tolerance test seems to reflect long term adaptations of the organism as a whole to the partial immobilization imposed by denervation of the skeletal muscle. After 3 and 7 days of denervation, the blood glucose removal rate in response to exogenous insulin does not alter in comparison with the control animal. This could be due, at least part, to the increase in sensitivity to insulin by the hepatic tissue. On the other hand, after 28 days of denervation, the increase observed in the blood glucose removal rate in response to insulin, is probably related to the increase in sensitivity to the hormone in the intact skeletal muscle, as suggested by the results of glucose uptake by the isolated soleus muscle in the opposite paw of the rats submitted to denervation. Briefly, the set of results of this study is indicative that the denervation of the skeletal muscle not only causes local metabolic alterations, but also may interfere with the glucose metabolism of the organism as a whole. Thus, rats submitted to partial immobilization by denervation of the skeletal muscle may constitute a useful model for the study of glucose homeostasis under the condition of immobilization.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva and Eduardo Custódio for technical assistance and Margery J. Galbraith for revising the manuscript. Research supported by the Brazilian Foundations: FAPESP, CNPq and Capes.

#### RESUMO

O estudo analisou os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação do músculo esquelético sobre o metabolismo glicídico. Ratos foram submetidos à secção do nervo ciático da pata direita. Observou-se redução da captação de glicose pelo músculo sóleo isolado da pata desnervada após 3 e 7 mas não após 28 dias em relação a animais

controle. Não houve diferença após 3 e 7 dias na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral intacta em relação ao controle. Houve aumento da captação de glicose nesta mesma pata 28 dias após a desnervação. A taxa de remoção da glicose em resposta à insulina exógena após 28 dias de desnervação foi significativamente superior à do controle e àquelas observadas após 3 e 7 dias da desnervação. Esses resultados sugerem que a imobilização por desnervação interfere não só no metabolismo da glicose no músculo esquelético envolvido como também em outros tecidos.

#### REFERENCES

- Bertelli, D.F.; Ueno, M.; Amaral, M.E.; Toyama, M.H.; Carneiro, E.M.; Marangoni, S.; Carvalho, C.R.; Saad, M.J.; Velloso, L.A.; Boschero, A. C. (2003), Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Apr;284(4):E679-87.
- Burant, C.F.; Lemmon S.K.; Treutelaar, M.K.; Buse, M.G. (1984), Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. *Am. J. Physiol.* Nov;247(5 Pt 1):E657-66.
- Buse, M.G.; Buse, J. (1959), Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. *Diabetes.* May-Jun;8(3):218-25.
- Coderre, L.; Monfar, M.M.; Chen, K.S.; Heydrick, S.J.; Kurowski, T.G.; Ruderman, N.B. & Pich, P.F.(1992), Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol.* 131 (4): 1821-1825.
- Davis, T. A. & Karl, I. E. (1988), Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in denervated muscle. *Biochem. J.* 254, 667-675.
- Day, C.S.; Riano, F.; Tomaino, M.N.; Buranatanitkit, B.; Somogyi, G.; Sotereanos, D. and Huard, J.(2001), Growth factor may decrease muscle atrophy secondary to denervation. *J. Reconstru. Microsurg.*, 1: 51-57.
- Doherty, R.O.; Stein, D.; Foley, J.(1997), Insulin resistance. *Diabetologia* 40:B10 – B15.
- Elmerndorf, J.S.; Damrau-Abney, A.; Smith, T.R.; David, T.S.; Turinsky, J. (1997), Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol.* Apr; 272(4 Pt 1):E661-70.

- Gumá, A.; Zierath, J. R.; Wallberg-Henriksson and Klip, A. (1995), Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 268 (Endocrinol. Metab. 31): E613 – E622.
- Guyton, A. C., Hall, J.E. (2000), *Textbook of Medical Physiology*. W.B Saunders Company, Philadelphia.
- Henriksen, E.J.; Rodnick, K.J.; Mondon, C.E.; James, D.E.; Holloszy, J.O. (1991), Effect of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 70(5):2322-2327.
- Hirose, M.; Kaneki, M.; Sugita, H.; Yasuhara, S.; Ibebunjo, C.; Martyn, J.A.; Iebunjo, C., (2001), Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism*. Feb;50(2):216-22.
- Hofmann, W.W. (1987), Musculotrophic effects of insulin receptors before and after denervation. *Brain Res.* Jan 20;401(2):312-21.
- Lin, Y.; Brady, M.J.; Wolanske, K.; Holbert, R.; Ruderman, N.B.; Yaney, G.C. (2002), Alterations of nPKC distribution, but not Akt/PKB activation in denervation rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, E318 – E325.
- Lo, S.; Russell, J.C.; Taylor, A.W. (1970), Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* Feb;28(2):234-6.
- Lundbaek, K. (1962), Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J.* Jun 2;5291:1507-13.
- Paassen-Ijkema, J.; Meek, M.F. and Gramsbergen, A. (2002), Reinnervation of muscle after transection of sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*, 6: 891 – 897.
- Saad, M. J. (1994), Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J. Med. Biol. Res.* 27(4): 941 – 957.
- Silva, R.G.; Almeida, C.C.A.; Luciano, E.; Mello, M.A.R. (2000), Protein malnutrition does not impair adaptations to exercise training. *Nutrition Research* v 20: n° 4, p.527 – 539.
- Smith, R.L.; Rach, P.J.; Lawrence, J.C. (1988), Insulin resistance in denervated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 263:658 – 665.
- Sowell, M. O.; Dutton, S.L.; Buse, M.G., (1989), Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 257:E418 – E425.
- Turinsky, J. (1987), Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol.* Mar;252(3 Pt 2):R531-7.
- Turinsky J. & Damrau-Abney A. (1998), Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. *Am. J. Physiol.* 275 (5pt2):R1425 – R1430.
- Wallis, M.G.; Appleby, G.J.; Youd, J.M.; Clark, M.G.; Penschow, J.D. (1999), Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated Hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. *Live Sciences*, Vol. 64, (4), pp.221

## ***APÊNDICE 2***

Nunes, WMS, Mello MAR. Metabolismo Glicídico em Ratos submetidos a  
Desnervação do Músculo Esquelético a ao Exercício de Natação.  
Revista Brasileira de Medicina do Esporte, RBME.  
(Aceito para publicação)

## Metabolismo Glicídico em Ratos Submetidos a Desnervação do Músculo Esquelético e ao Exercício de Nataçãõ.

WILTON MARLINDO SANTANA NUNES<sup>1</sup>, MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO<sup>1</sup>.

1. Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP- Rio Claro, SP, Brasil.

### **Endereço para correspondência:**

Wilton Marlindo Santana Nunes

Rua Dom Pedro II, 2030 apto 72 Bairro alto

13419-210 – Piracicaba, SP

Tel: (19) 3434-68-48

e-mail:wmsnunes@terra.com.br

## RESUMO

A desnervação do músculo esquelético implica em alterações do metabolismo da glicose bem conhecidas, porém pouco se sabe sobre a influência destas alterações na sensibilidade periférica à insulina do animal como um todo. O presente estudo visou analisar o metabolismo da glicose no músculo sóleo de ratos submetidos à desnervação bem como a resposta do animal à insulina exógena e ao exercício.

Ratos Wistar de 3 a 5 meses foram submetidos a secção do nervo ciático da pata direita. Após 48 horas metade iniciou programa de natação, 1 hora/dia, 5 dias/semana. Como controle foram utilizados animais íntegros, submetidos ou não ao exercício. Decorridos 28 dias, para a avaliação da resposta à insulina, os ratos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Os resultados foram analisados através da determinação da taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt). Em outro lote de animais, fatias do músculo sóleo desnervado e da pata contralateral íntegra foram incubadas na presença de glicose (5,5mM), contendo [<sup>3</sup>H]2-deoxiglicose (0,5μCi/mL) e [U<sup>14</sup>C] glicose (0,25μCi/mL) e insulina (100μU/mL), para análise de captação, oxidação da glicose e síntese de glicogênio. Ratos desnervados submetidos ao exercício apresentaram Kitt (%/min) superior (7,22 ± 0,49) aos dos sedentários (5,31 ± 0,22), e dos controles sedentários (4,53 ± 0,27). A captação da glicose (3,55 ± 0,21 μmol/g.h) pelo músculo desnervado, foi inferior à do músculo contralateral no rato sedentários (5,12 ± 0,38 μmol/g.h). O exercício crônico elevou a captação e a oxidação da glicose no músculo desnervado (captação: 5,70 ± 0,41, oxidação: 20,54 ± 1,97) e contralateral (captação: 6,53 ± 0,37, oxidação: 20,39 ± 1,91). O mesmo aconteceu com o grupo controle exercitado. Esses resultados sugerem que alterações restritas do metabolismo glicídico muscular influenciaram a resposta à insulina do animal como um todo. Além disso, o exercício melhorou o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado.

**Palavras-chaves:** Treinamento. Transporte de glicose. Imobilização.

## ABSTRACT

Denervation of the skeletal muscles involves well known alterations of the glucose metabolism, however, little is known about the influence of these alterations on the peripheral sensitivity to insulin of the animal as a whole. This study aimed to analyze the metabolism of glucose in the soleus muscle of rats submitted to denervation as well as the animal's response to exogenous insulin and to exercise.

Wistar rats from 3 to 5 months old were submitted to section of the sciatic nerve in the right paw. After 48 hours, half of them started a swimming program of 1 hour/day, 5 days/week. As control, whole animals were used, either submitted to exercise or not. After 28 days had elapsed, for evaluating the response to insulin, the rats were submitted to the insulin tolerance test. The results were analyzed by determining the blood glucose removal rate (Kitt). In another lot of animals, slices of the denerved soleus muscle and opposite whole paw were incubated in the presence of glucose (5.5mM), containing [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose (0.5 $\mu$ Ci/mL) and [U<sup>14</sup>C] glucose (0.25 $\mu$ Ci/mL) and insulin (100 $\mu$ U/mL), for analyzing glucose uptake, oxidation and glycogen synthesis. Denerved rats submitted to exercise presented with KiTT (%/min) higher ( $7.22 \pm 0.49$ ) than the sedentary animals ( $5.31 \pm 0.22$ ), and the sedentary control animals ( $4.53 \pm 0.27$ ). Glucose uptake ( $3.55 \pm 0.21$   $\mu$ mol/g.h) by the denerved muscle was lower than those of the opposite muscle in the sedentary rats ( $5.12 \pm 0.38$   $\mu$ mol/g.h). Chronic exercise raised glucose uptake and oxidation in the opposite muscle (uptake:  $6.53 \pm 0.37$ , oxidation:  $20.39 \pm 1.91$ ) and in the denerved muscle (uptake:  $5.70 \pm 0.41$ , oxidation:  $20.54 \pm 1.97$ ). The same happened with the exercised control group. These results suggest that restricted alterations of the muscular glucose metabolism influenced the response to insulin of the animal as a whole. Furthermore, exercise improved the uptake and use of glucose in the denerved muscle.

**Key word:** Training. Glucose transport. Immobilization

## INTRODUÇÃO

A glicose é o principal substrato energético do organismo. Por este motivo, tem-se estudado exaustivamente o seu metabolismo em processos fisiológicos e patológicos. A resistência periférica a insulina está relacionada à diminuição do efeito normal da insulina em estimular os processos biológicos e regulatórios ao nível celular. No caso da homeostasia da glicose, resistência à insulina geralmente refere-se a diminuição do efeito da insulina em estimular o transporte da glicose e seu metabolismo na musculatura esquelética e no tecido adiposo, concomitante com aumento da produção de glicose pelo fígado<sup>(1)</sup>. Estas características relatadas proporcionam conhecidamente a diminuição da sensibilidade periférica a insulina.

A diminuição da captação da glicose pelos tecidos alvo está associada à falhas tanto no mecanismo de acoplamento do hormônio ao seu receptor específico, quanto nos eventos pós-receptor<sup>(2)</sup>. A autofosforilação do receptor de insulina (IR), fosforilação em tirosina dos substratos do receptor da insulina (IRSs) pelo IR, e subsequente ligação da fosfatidilinositol 3-Cinase (PI3-K) pelo IRSs são passos essenciais para a ação metabólica da insulina<sup>(3)</sup>.

O desuso crônico da musculatura esquelética, produzida por inatividade devida a condições de repouso, imobilização de membros e microgravidade, induz resistência local à insulina e a um estado catabólico que afeta a musculatura esquelética<sup>(4,5,6,7)</sup>. Estudos com animais, incluindo ratos, têm confirmado que a imobilização está associada à redução da captação da glicose induzida pela insulina<sup>(8,9)</sup>. Resistência à insulina é também o maior problema em portadores de certas patologias, que implicam em inatividade e/ou imobilização. Sabe-se que a imobilização do tecido muscular por desnervação causa inúmeras alterações locais, onde a captação de glicose e a síntese do glicogênio são diminuídas, assim como a sensibilidade à insulina<sup>(10)</sup>. Ocorre redução da atividade das vias reguladoras do metabolismo da glicose e da expressão gênica dos transportadores de glicose<sup>(11)</sup>, associada ao processo de atrofia<sup>(12,13)</sup>.

Exercício, em contraste com a imobilização, aumenta a sensibilidade à insulina em humanos e em ratos<sup>(14,15)</sup>.

Na musculatura esquelética, o transporte de glicose é mediado pela proteína transportadora de glicose GLUT-4. Atividade contrátil afeta consideravelmente o metabolismo da glicose e a resposta à insulina na musculatura esquelética. Durante a contração muscular, a captação de glicose é aumentada proporcionando um aumento do transporte da glicose para o interior do músculo favorecendo a via glicolítica. Imediatamente após a atividade contrátil, a captação da glicose pelo músculo permanece elevada e é canalizada, primeiramente, para o reabastecimento dos estoques de glicogênio. Embora a insulina não seja solicitada para o aumento da captação de glicose depois da atividade contrátil a dose necessária para a estimulação da captação da glicose pela musculatura esquelética é diminuída, sugerindo um aumento na sensibilidade à insulina pelo tecido muscular esquelético<sup>(16)</sup>. A insulina aumenta o transporte de glicose pela translocação de moléculas GLUT-4 provenientes de depósitos intracelulares para a membrana plasmática<sup>(17)</sup>.

Na busca da compreensão dos processos que levam à resistência à insulina, vários modelos foram propostos nas últimas décadas, dentre estes, a desnervação do músculo esquelético. O exato mecanismo molecular de sinalização intracelular, que é mediado pelo receptor da insulina e que resulta em diversas respostas biológicas, foi apenas parcialmente elucidado nesse modelo de desnervação<sup>(18)</sup>.

Segundo Turinsky<sup>(19)</sup>, o efeito da desnervação no metabolismo muscular é influenciado pela população de fibras musculares e o fenômeno da desordem metabólica provocada pela desnervação inicia-se entre 3 a 6 horas após a secção do nervo. A interrupção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina, mostrada primeiramente por Buse e Buse<sup>(20)</sup>. Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura desnervada, sendo o músculo da pata contralateral utilizado como controle<sup>(18)</sup>.

Vários estudos relacionados com atividade física demonstram que exercícios aeróbicos e de força regulares atenuam a intolerância à glicose e aumentam a

sensibilidade à insulina em adultos sedentários e diabéticos não dependentes de insulina<sup>(21,22,23)</sup>.

Por outro lado, poucos estudos abordam os efeitos das alterações musculares decorrentes da imobilização de longa duração por desnervação sobre a manutenção da homeostase glicêmica pelo organismo como um todo. Mais raros ainda são os estudos que avaliam os efeitos do treinamento físico sobre a musculatura desnervada e a homeostase glicêmica.

Considerando a falta de estudos sobre os efeitos da desnervação de longa duração, sobre o metabolismo da glicose, e a atividade física, o presente estudo visou analisar os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação de longa duração do músculo esquelético no metabolismo glicídico de ratos, submetidos ou não à natação.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 3 a 5 meses fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, SP. Os animais tiveram livre acesso ao alimento e ração (Purina para roedores) e à água “*ad libitum*”, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12h à temperatura de 25° C. Para a desnervação, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico, (Thiopental, ABBOTT, SP), na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal e tricotomizados na porção posterior das coxas por onde uma porção do nervo ciático, de aproximadamente 1 cm, da pata direita foi seccionada e retirada, segundo o modelo de desnervação proposto por Coderre et al, 1992. Após 28 dias da desnervação, nova incisão foi feita na porção posterior da coxa da pata desnervada, onde por inspeção visual, certificou-se de que não houve reinervação da porção seccionada do nervo ciático. Os ratos foram divididos em 4 grupos; Controle: animal intacto; Desnervado 28 dias: analisado 28 dias após a desnervação; controle/natação: animal intacto submetido a 28 dias de treinamento físico; Desnervado 28 dias/natação: analisado após 28 dias da desnervação e treinamento físico. O treinamento físico consistiu de natação 1 hora/dia, 5 dia/semana, em tanques coletivos contendo água a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , realizado no período da manhã (8:00 – 9:00 hs).

Numa primeira serie de experimentos, o metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado foi verificado após sacrifício dos animais por decapitação, em repouso, os treinados após 48 horas da ultima sessão de treino. O músculo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25 – 35 mg foram primeiro incubadas por 30 min a 37° C em banho Maria de Dubinoff (FANEN, MODELO 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%; HEPES 6,64 mM; KCl 0,032% CaCl<sub>2</sub> 1,14 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,015%; NaHCO<sub>3</sub> 0,19%; MgSO<sub>4</sub> 0,03%) equilibrado com a mistura de 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>, pH 7,4. Após este período, a fatia muscular foi transferida para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de

tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [U<sup>14</sup>C] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2DG, 0,5 µCi/mL) e insulina (100 µM/mL). Dentro do frasco externo, foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700µL de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nessa última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa de plástico, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema, contendo as fatias de músculo, foi incubado em banho Maria de Dubinoff por 60 min. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO<sub>2</sub> foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e o CO<sub>2</sub> foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37°C. O lactato produzido foi determinado pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C do meio de incubação do frasco externo, depois da separação do substrato usando coluna de troca iônica Dowex-2. A incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no precipitado obtido durante o processo de extração do glicogênio muscular<sup>(24)</sup>. A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no líquido contido no frasco interno. A captação da glicose (2DG) foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do <sup>3</sup>H+. Toda a medição da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno. Em série separada de experimentos, usando ratos nas mesmas condições da série anterior, a resposta à insulina exógena foi avaliada através do teste de tolerância à insulina intravenosa (ittiv). Animais de todos os grupos receberam insulina (mista regular purificada), injetada na veia peniana na concentração de 1UI/mL na dose de 1UI/Kg de peso corporal. Amostras de sangue (100 µl) foram coletadas a partir da veia femoral em seringas de 1 mL antes (tempo 0) e após 2:30, 5:00, 10:00, e 20:00 (min:s) da administração da insulina, para determinação da glicose sérica. A taxa de remoção de glicose

(Kitt), durante o teste de tolerância à insulina, foi calculada de acordo com Lundbaek<sup>(25)</sup> utilizando-se o programa de computador ORIGIN® 6.0. A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey, onde apropriado. Em todos os casos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Na primeira série de experimentos, observou-se aumento da captação de glicose pelo músculo sóleo tanto da pata desnervada quanto da pata contralateral do animal submetidos a exercício de natação após 28 dias em relação ao animal controle (figura 1). O mesmo ocorreu com o animal controle submetido ao exercício de natação por 28 dias (figura 1). Em contrapartida, não houve diferença na captação da glicose pelo músculo sóleo tanto da pata desnervada quanto da pata contralateral entre o grupo desnervado sedentário e o grupo controle intacto mantido sedentário (figura 1).

Foram, ainda, analisadas a oxidação da glicose e a incorporação da glicose (síntese) em glicogênio pelo músculo sóleo isolado. Não houve diferença na oxidação da glicose, entre as patas desnervada e contralateral dos animais desnervado por 28 dias sedentários, e o grupo de animais controle intacto sedentário (figura 2). Por outro lado, a oxidação da glicose aumentou significativamente tanto no grupo de animais controle quanto no grupo de animais desnervados submetidos a exercício de natação. Este aumento ocorreu tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral do mesmo animal (figura 2). Com relação à incorporação da glicose em glicogênio, houve aumento na pata desnervada dos animais após 28 dias de cirurgia, mas não na pata contralateral do mesmo animal em relação aos animais controle intacto. Por outro lado, houve diminuição da incorporação da glicose em glicogênio no músculo sóleo dos animais desnervados submetidos ao exercício de natação tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral e no sóleo de animais controle intacto submetidos a exercício de natação em relação ao animal controle sedentário intacto (figura 3).

Em uma segunda série de experimentos, foi avaliada a taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt) em ratos submetidos ao teste de tolerância à insulina endovenosa (ittiv). Os resultados obtidos acham-se na figura 4. Os valores de Kitt dos animais após 28 dias de desnervação submetidos ou não ao exercício de natação, foram significativamente maiores do que os animais controle sedentário intacto e controle submetido ao exercício de natação (figura 4).

## DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a captação de glicose pela musculatura esquelética induzida pelo hormônio insulina, foi aumentada nos grupos controle e desnervado submetidos a exercício de natação. O aumento da captação da glicose pela musculatura é evidenciado tanto na pata desnervada quanto na pata contralateral dos animais que foram submetidos a desnervação por um período de 28 dias. No entanto, a captação de glicose pelo músculo sóleo dos animais do grupo desnervado após 28 dias que mantidos sedentários, quanto do músculo sóleo dos animais do grupo controle sedentário, não mostraram diferenças significativas.

Estudos referentes a desnervação, e sua implicação na captação da glicose pelo músculo esquelético, demonstram que animais que sofreram desnervação do músculo sóleo apresentam diminuição na captação da glicose num período de até 7 dias<sup>(19,26,27)</sup>. Segundo Aksnes et al.,<sup>(28)</sup> na desnervação da musculatura esquelética de rato, a resistência à insulina é acompanhada pela diminuição do conteúdo de transportadores de glicose (Glut4). No entanto, Davis & Karl,<sup>(18)</sup> verificaram em seus experimentos que a captação da glicose no músculo sóleo aumentava após o sétimo dia de desnervação e continuava a aumentar ainda mais ao décimo dia após a desnervação. Estes achados mostram que, o músculo sóleo desnervado, de alguma maneira ainda a ser investigada, adapta-se ao estado desnervado, proporcionando uma recuperação na captação da glicose, igualando à situação dos animais controle. A contração e a insulina têm um efeito aditivo no transporte da glicose no músculo esquelético, sugerindo que os dois agem estimulando vias parcialmente independentes<sup>(29)</sup>. O treinamento físico aumenta a expressão de Glut4 na musculatura esquelética e melhora a tolerância a glicose e a ação da insulina no organismo como um todo<sup>(30)</sup>. Exercício tem múltiplos efeitos no metabolismo da glicose e na expressão gênica. No entanto, pouco se conhece sobre o mecanismo pelo qual a atividade física, aumenta a responsividade à insulina e ao transporte da glicose no músculo esquelético<sup>(30)</sup>.

O exercício físico é um estímulo para a regulação de processos metabólicos e transcripcionais na musculatura esquelética favorecendo a

captação de glicose como a síntese protéica que são fundamentais para a homeostase muscular<sup>(31)</sup>. Neste trabalho pudemos observar que o aumento da captação de glicose foi evidente no músculo sóleo de animais controles submetidos à natação e este aumento foi também verificado no músculo sóleo da pata contralateral e desnervada dos animais que foram submetidos ao exercício de natação. Estes dados sugerem que os mecanismos de sinalização interna da musculatura esquelética, que proporcionam a captação da glicose provavelmente são recuperados nos animais desnervados depois de um período de 28 dias, e que o exercício físico tem um papel fundamental na melhora da captação da glicose no músculo sóleo. Isso provavelmente é devido ao aumento da sensibilidade a insulina proporcionada pela atividade física.

A captação da glicose pelo músculo sóleo se faz através das isoformas dos transportadores sensíveis ou não a insulina cuja função é transportar a glicose para o citosol. A regulação da captação da glicose na musculatura esquelética ocorre de varias maneiras, onde a insulina, a atividade metabólica do tecido e a atividade contrátil das fibras musculares são fundamentais. No músculo, a insulina promove a translocação de Glut4 para a membrana celular, elevando a captação de glicose que pode ser oxidada ou direcionada para a formação dos estoques de glicogênio<sup>(32)</sup>. Por essa razão, neste estudo foram analisadas a oxidação da glicose e a incorporação da glicose em glicogênio dos animais dos diferentes grupos experimentais. A oxidação da glicose na musculatura esquelética foi aumentada nos animais que foram submetidos ao exercício físico por natação tanto na pata contralateral quanto na pata desnervada. Igual fenômeno foi observado nas patas dos animais controles treinados. Estes dados estão de acordo com a literatura que indica melhoria do condicionamento aeróbio com o exercício moderado<sup>(33)</sup>. No entanto, não houve diferença na oxidação da glicose entre os animais controle e os animais desnervados após 28 dias mantidos sedentários. Por outro lado, a incorporação da glicose em glicogênio foi diminuída nos animais que foram submetidos à atividade física tanto no grupo controles quanto no grupo

desnervado após 28 dias, em relação ao controle e ao grupo desnervado após 28 dias mantidos sedentários.

Estes resultados demonstram a priorização da via glicolítica no exercício em detrimento a síntese de glicogênio. Mudanças bioquímicas observadas na desnervação incluem variação na concentração e na atividade de enzimas envolvida na glicólise e na fosforilação. Alternativamente, o período de 48 h decorrido entre a última sessão de treinamento e o sacrifício dos animais, pode ser insuficiente para a reposição do glicogênio muscular, conduzindo aos baixos valores observados nos ratos exercitados. Estas alterações precisam ser mais bem investigadas.

O Aumento da concentração de cAMP, proteína Kinase dependente de cAMP e da atividade da adenilciclase são verificadas em músculo desnervado como também uma redução da atividade da glicogênio sintase e na glicogênio fosforilase<sup>(34,35)</sup>. Essas mudanças se iniciam após poucas horas de desnervação da musculatura esquelética e variam de acordo com o tipo de fibra muscular. No entanto, os resultados obtidos nos animais sedentários neste experimento com relação à oxidação e a incorporação da glicose em glicogênio demonstram que houve recuperação dos processos metabólicos que envolvem a glicose no desnervado crônico. Após estas constatações, partimos para análise do efeito da desnervação e do exercício sobre a taxa de remoção da glicose sanguínea (Kitt) nos animais desnervados e íntegros. A taxa de remoção da glicose após administração da insulina exógena foi significativamente aumentada nos ratos após 28 dias de desnervação submetidos ou não ao exercício de natação em relação aos controles íntegros. Estes dados demonstram que a resposta da glicose à insulina exógena é alterada em animais desnervados e que a sensibilidade à insulina é maior quando a musculatura após 28 de desnervação é submetida a exercício de natação. A ação do exercício sobre o transporte de glicose é mediada através de processo associado com a contração muscular. Estudos demonstraram que os efeitos da insulina e da contração muscular são aditivos, sugerindo que a insulina e o exercício atuam nos transportadores de glicose por diferentes mecanismos<sup>(36)</sup>. Assim sendo, o movimento passivo das patas desnervada em

conseqüência da movimentação dos animais na água pode ter estimulado a contração do músculo e contribuindo para o aumento da sensibilidade à insulina exógena nos animais treinados por natação.

Resumidamente, o conjunto dos nossos resultados indicam que alterações restritas do metabolismo glicídico muscular influenciaram significativamente a resposta à insulina do animal como um todo. Além disso, o exercício melhorou o aporte e a utilização da glicose no músculo desnervado assim como influenciou a resposta à insulina pelo animal.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Cústódio pelo apoio técnico. Apoio financeiro: FAPESP, CNPq e Capes.

## REFERÊNCIAS

1. Henriksen EJ, Saengsirisuwan V. Exercise training and antioxidants: Relief from oxidative stress and insulin resistance. *Exerc Sport Sci Rev* 2003; 31:79 – 84.
2. Saad MJ. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27:941 – 957.
3. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking protein that mediate insulin action and cytokine action. *Recent. Prog Horm Res* 1998; 53:119-133.
4. Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-street J, Wolfe RR. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996; 270:E627 – E 633.
5. Shangraw RE, Stuart CA, Prince MJ, Peters EJ, Wolfe RR. Insulin responsiveness of protein metabolism in vivo following bed rest in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1988;255:E548 – E558.
6. Stein TP, Schulter MD, Boden G. Development of insulin resistance by astronauts during spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 1994; 65:1091–1096.
7. Stuart CA, Shangraw RE, Prince MJ, Peters EJ, Wolfe RR. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. *Metabolism* 1988;37:802 – 806.
8. Booth FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1982; 52:1113 – 1118.

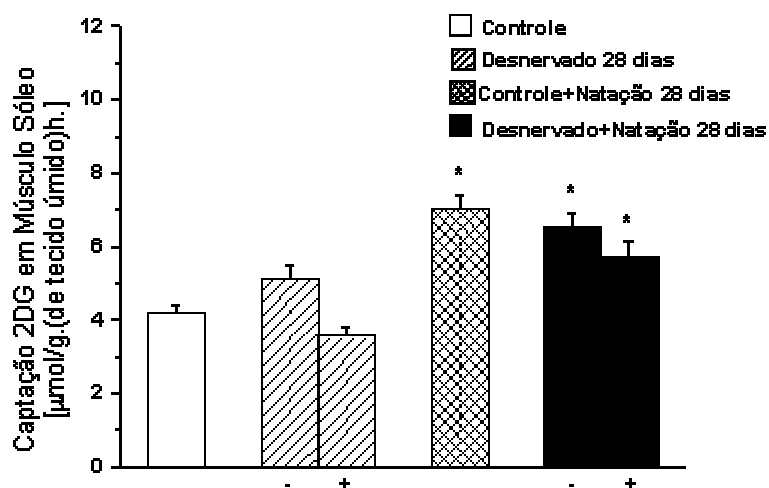
9. Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995;268:E980 – E986.
10. Sowell MO, Dutton SL, Buse MG. Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989;257:E418 –E425.
11. Elmendorf JS, Damrau-Abney A, Smith TR, David TS, Turinsky J. Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol* 1997;272:E661-70.
12. Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol* 1992;131:1821-1825.
13. Henriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 1991;70:2322-2327.
14. Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 1997; 273:E1039 – E1051.
15. Kim Y, Inoue T, Nakajima R, Nakae K, Tamura T, Tokuyama K, et al. Effects of endurance training on gene expression of insulin signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:766 – 773.
16. Davis TA, Karl IE. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in desnervated muscle. *J Biochem* 1988; 254:667-675.

17. Gumá A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson, Klip A. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995;268:E613 – E622.
18. Bertelli DF, Ueno M, Amaral ME, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, et al. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E679-87.
19. Turinsky J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol* 1987;252:R531-7.
20. Buse MG, Buse J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. *Diabetes* 1959; 8:218-25.
21. Houmad JA, Shinebarger M H, Dolam PL, Leggett-Frazier N, Bruner RK, McCammon MR, Israel RG, Dohm GL. Exercise training increase Glut-4 protein concentration I previously sedentary middled-aged men. *Am Journal Physiol* 1993;264:E896 – E901.
22. Smutok MA, Reece C, Kokkinos PF, Farmer CM, Dawson PK, DeVane J, et al. Effects of exercise training modality on glucose tolerance in men with abnormal glucose regulation. *Int J Sports Med* 1994;15;283 – 289.
23. Cox JH, Cortright RN, Dohm GL, Houmard JA. Effect of aging on response to exercise training in humans: skeletal muscle Glut-4 and insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 1999;86:2019 – 2025.
24. Sjorgreem B, Nordenskjold DT, Holmgren H, Wollerstrom J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. *Pfluger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere* 1938:240;247.

25. Lundbaek K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962;5291;1507 – 1513.
26. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Ibebunjo C, Martyn JA, et al. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism* 2001;50:216-22.
27. Turinsky J. & Damrau-Abney A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. *Am J Physiol* 1998;275:R1425 – R1430.
28. Aksnes AK, Hjeltnes N, Wahlstrom EO, Katz A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson. Intact glucose transport in morphologically altered denervated skeletal muscle from quadriplegic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996;271; E593-E600.
29. Ihlemann J, Ploug T, Hellsten Y, Galbo H.; Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999;277:E208-14.
30. Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook A, et al. 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* 2000;97;38-43.
31. Sakamoto K, Goodyear LJ. intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2002;93:369-83.
32. Klip A, Marette A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *J Cell Biochem* 1992;48:51-60.

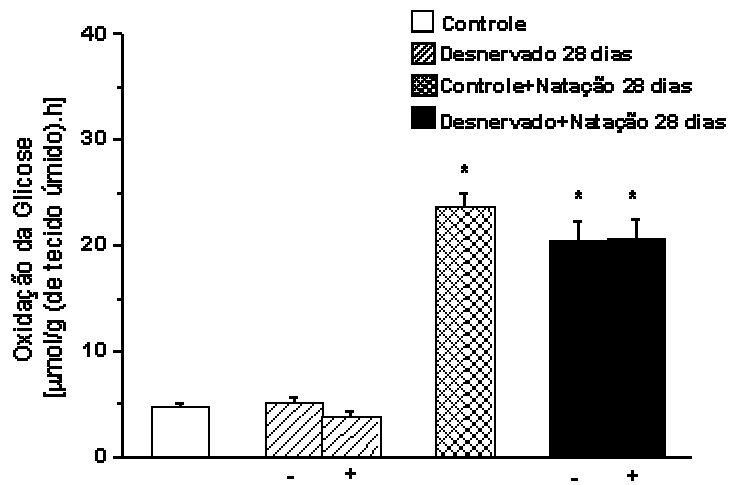
33. Matzinger O, Schneiter P, Tappy L.. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E125-31.
34. Frostick SP. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. *Int Angiol* 1995;14:278-87.
35. Wallis MG, Appleby GJ, Youd JM, Clark MG, Penschow JD. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. *Life Science.* 1999;64:221-8.
36. Kirwan JP, del Aguila LF, Hernandez JM, Williamson DL, O'Gorman DJ, Lewis R, et al., Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 88(2):797-803.

Figura 1



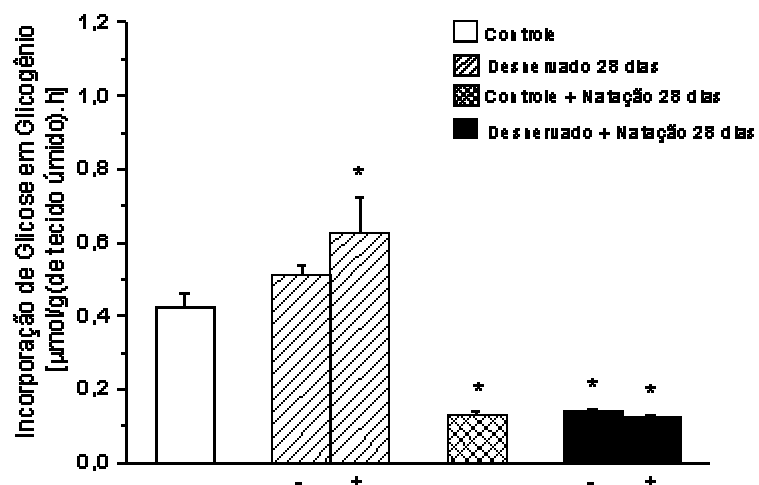
**Figura 1:** Captação de glicose pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos de todos os grupos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde à pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 7$  a 10 fatias musculares.

Figura 2



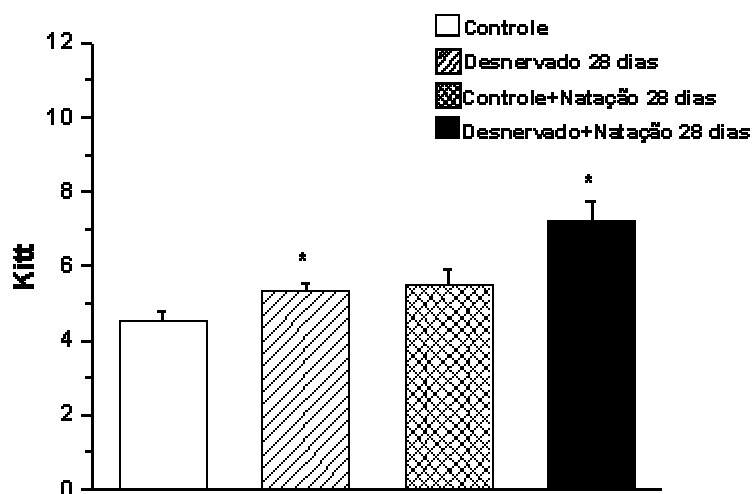
**Figura 2:** Oxidação da glicose pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos de todos os grupos. O sinal (+) refere-se a pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde a pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 8$  a  $10$  fatias musculares.

Figura 3



**Figura 3:** Incorporação da glicose em glicogênio pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) dos ratos de todos os grupos. O sinal (+) refere-se à pata desnervada enquanto o sinal (-) corresponde a pata contralateral do mesmo rato. O controle refere-se ao animal intacto. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 10$  a 13 fatias musculares.

Figura 4



**Figura 4:** Taxa de remoção da glicose sangüínea (KiTT), durante o teste de tolerância a insulina (média  $\pm$  erro padrão) em ratos de todos os grupos. Controle referente a todos os animais. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao rato controle.  $n = 8$  a  $10$  animais por grupo.

## ***APÊNDICE 3***

Nunes, WMS, Mello MAR. Efeito da Desnervação do Músculo Esquelético Sobre a Secreção de Insulina e o Metabolismo da Glicose em Ratos.

**EFEITO DA DESNERVAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO SOBRE A  
SECREÇÃO DE INSULINA E O METABOLISMO DA GLICOSE EM RATOS.**

WILTON MARLINDO SANTANA NUNES, MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO.

*Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, Universidade  
Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro, SP, Brasil.*

**Endereço para correspondência:**

Wilton Marlindo Santana Nunes

Rua Dom Pedro II, 2030 apto 72 Bairro alto

13419-210 – Piracicaba, SP

Tel: (19) 3434-68-48

e-mail:wmsnunes@terra.com.br

## RESUMO

A desnervação do músculo esquelético implica em alterações metabólicas locais que incluem diminuição da captação de glicose e da síntese de glicogênio, bem como dos estoques desse substrato. Tais alterações aparecem associadas à inibição das etapas iniciais da sinalização da insulina e resistência à ação do hormônio. Por outro lado, pouco se sabe sobre os efeitos sistêmicos da imobilização por desnervação. O presente estudo visou analisar os efeitos locais e sistêmicos da imobilização por desnervação sobre a secreção de insulina e a homeostase glicêmica. Ratos da linhagem wistar com 3 a 5 meses de idade foram submetidos à secção do nervo ciático da pata esquerda. Após 3, 7 e 28 dias, fatias do músculo sóleo desnervado e da pata contralateral foram extraídas e incubadas em presença de 5 mM de glicose, contendo [<sup>3</sup>H]2-deoxiglicose, e 100 μU/mL de insulina para a análise da captação de glicose. Em série separada de experimento foram também isoladas ilhotas pancreáticas desses animais e incubadas em presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,6 e 16,7 mmol/L) para análise da secreção estática de insulina. Como controles foram utilizados animais íntegros. Em outro experimento procedeu-se à realização de teste de tolerância à glicose (GTT). Para a realização do GTT os ratos receberam soluções de glicose 50%, 1g/Kg de peso corporal, intravenoso (iv). Foram coletadas amostras de sangue para dosagem de glicose antes e 5, 10, 20, 40, 80 min após a administração da glicose. Os resultados do GTT foram avaliados através da determinação das áreas sob as curvas séricas de glicose ( $\Delta G$ ) durante o teste através da metodologia trapezoidal, com o auxílio do programa de computador ORIGIN® 6.0. Após o teste de tolerância a glicose intravenosa (gttiv), fatias do tecido hepático e muscular (sóleo) foram separadas para determinação do conteúdo do glicogênio. Observou-se redução da captação de glicose (mmol/g.h) na pata desnervada após 3 e 7 mas não após 28 dias em relação a pata dos animais controle. Não houve diferença significativa após 3 e 7 na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral intacta em relação ao controle. Em contra partida, verificou-se aumento da captação de glicose nesta mesma pata após, 28 dias. Houve aumento da secreção da

insulina (ng/ilhota/90min) às concentrações de glicose de 8,3mM e 16,7mM após 28 dias de desnervação em relação as mesmas concentrações do grupo controle respectivamente. Não houve diferença na área sob a curva de glicose sérica durante o gttiv e no conteúdo de glicogênio hepático dos grupos. No entanto, o glicogênio muscular tanto da pata desnervada quanto da pata íntegra do grupo 28 dias foi reduzido após gttiv. Também o glicogênio da pata desnervada após 7 dias mostrou-se inferior ao controle. Esses resultados sugerem que a imobilização por desnervação interfere não só no metabolismo da glicose no músculo esquelético desnervado como também em outros tecidos.

**Palavras chaves:** Secreção de insulina, Desnervação, Metabolismo da glicose.

## ABSTRACT

Denervation of the skeletal muscle involves local metabolic changes that include a reduction in glucose uptake and glycogen synthesis, as well as in the stocks of this substrate. Such changes appear associated with the inhibition of the initial stages of insulin signals and resistance to action of the hormone. On the other hand, little is known about the systemic effects of immobilization by denervation. This study aimed to analyze the local and systemic effects of immobilization by denervation on the secretion of insulin and glycemic homeostasis. Wistar breed rats aged from 3 to 5 months old were submitted to section of the sciatic nerve in the left paw. After 3, 7 and 28 days, slices of the de-nerved soleus muscle and of the opposite paw were extracted and incubated in the presence of 5 mM of glucose containing [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose, and 100 μU/mL of insulin, in order to analyze glucose uptake. In a series separately from the experiment, pancreatic islets of these animals were also isolated and incubated in the presence of growing concentrations of glucose (2.8; 5.6; 8.6 and 16.7 mmol/L) in order to analyze static insulin secretion. Whole animals were used as controls. In another experiment, the test for tolerance to glucose (GTT) was proceeded with. In order to carry out GTT, the rats received 50% glucose solutions, 1g/Kg of body weight intravenously (iv). Blood samples were collected for glucose dosing before and 5, 10, 20, 40 and 80 min. after glucose administration. The results of the GTT were assessed by determining the areas under the serum glucose curves (ΔG) during the test, by means of the trapezoidal methodology, with the aid of the computer program ORIGIN® 6.0. After the intravenous glucose tolerance test (GTTiv), slices of the

hepatic and muscular (soleum) tissues were separated to determine the glycogenic content. A reduction was observed in the uptake of glucose (mmol/g.h) in the denervated paw after 3 and 7 days, but not after 28 days in relation to the control animal paws. There was no significant difference after 3 and 7 days in glucose uptake by the soleus muscle of the opposite intact paw in relation to the control. On the other hand, there was increased glucose uptake in this same paw after 28 days. There was an increase in insulin secretion (ng/islet/90min) at the glucose concentrations 8.3mM and 16.7mM after 28 days of denervation, in relation to the same concentrations of the control group respectively. There was no difference in the area under the serum glucose curve during GTTiv and the hepatic glycogen content of the groups. However, the muscular glycogen both in the denerved and whole paw of the 28-day group was reduced after GTTiv. Furthermore, the glycogen in the denervated paw after 7 days was shown to be lower than that of the control. These results suggest that immobilization by denervation interferes not only in the metabolism of glucose in the de-nervated skeletal muscle but also in other tissues.

**Key Words:** Insulin secretion, Denervation, Glucose metabolism.

## INTRODUÇÃO

A conseqüência mais dramática da desnervação é o processo de hipotrofia que se instala na musculatura esquelética. A hipotrofia é um processo multifatorial afetando não só o mecanismo contrátil uma vez que gera paralisia muscular bem como altera o metabolismo muscular diminuindo tanto a atividade das vias metabólicas quanto a capacidade de absorver inúmeros substratos que dependem e estão associado com a sensibilidade à insulina, isto leva a fraqueza muscular e perda de massa (HUNTER et al., 2002). O músculo esquelético tem um papel fundamental na manutenção das concentrações normais da glicose e na regulação corpórea do metabolismo de carboidratos. O metabolismo da glicose no músculo esquelético é uma das vias mais estudadas por correntes de pesquisadores no mundo todo.

Sabe-se que o tecido muscular responsável pela locomoção necessita de substratos energéticos, sendo carboidratos e lipídios os principais combustíveis requisitados pelo tecido muscular (SINACORE and GULVE, 1993). Para que a glicose cumpra o seu papel no músculo esquelético como substrato energético, é necessário que a glicose seja captada.

A captação da glicose pela musculatura esquelética se dá através de diferentes processos. Um deles se inicia com o acoplamento da insulina ao seu receptor específico localizado na membrana da célula muscular, e para que isso ocorra, é necessária a secreção da insulina pela célula B pancreática. O processo secretório da insulina pela célula B pancreática é estimulado por substratos energéticos metabolizáveis na célula B pancreática, sendo a glicose o secretagogo mais importante. A glicose é transportada para o interior da célula B por uma proteína integral de membrana, denominada transportador de glicose nº 2 (Glut 2). Após entrar na célula B, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P). O destino preferencial da G-6-P na célula B é a glicólise (Boschero, 1996). O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido em Acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH). Subseqüentemente, a acetil-CoA entra no Ciclo de Krebs levando a um aumento de nicotinamida adenina de nucleotídeo (NADH) e flavina adenina de nucleotídeo (FADH<sub>2</sub>). O metabolismo de glicose gera ATP e a fração de

ATP/ADP é aumentada no citoplasma. Com o aumento da fração ATP/ADP, os canais de potássio se fecham ocorrendo à despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio, sensíveis a voltagem. O aumento do influxo do cálcio para a célula B resulta no processo secretório da insulina (PERALES et al., 1991, RADOSAVLJEVIC et al., 2004).

Após a sua secreção, a insulina se liga ao seu receptor específico na membrana celular das inúmeras células onde a musculatura esquelética é a principal delas. Ao se ligar no receptor específico na musculatura esquelética, a insulina ativa múltiplas vias sinalizadoras através da fosforilação do resíduo de tirosina específico na porção beta intracelular do receptor de insulina (HIROSE et al., 2001). Este acoplamento entre a insulina e seu receptor específico desencadeia uma reação em cascata intracelular que culmina na translocação dos GLUT-4 para a membrana e posterior entrada da glicose na célula. O Segundo processo pelo qual a glicose entra na célula muscular é pela contração que culmina no processo de translocação do GLUT-4 até a membrana plasmática da célula muscular e posterior entrada da glicose. O terceiro processo é através do GLUT-1, transportador responsável pela captação da glicose para a manutenção do metabolismo basal do tecido muscular. É importante salientar que a captação da glicose através do GLUT-1, não é dependente da insulina e nem do processo contrátil da musculatura. Após a glicose ser captada pelos GLUT-4 e ou GLUT-1, segue-se à via de armazenamento em glicogênio ou via glicolítica (oxidação) para a produção de energia (ATP). A função do GLUT-1 é captar glicose suficiente para manter o metabolismo basal do tecido muscular esquelético em repouso (HIROSE et al., 2001).

Na busca da compreensão dos processos que levam à resistência à insulina, vários modelos foram propostos nas últimas décadas, dentre estes, a desnervação do músculo esquelético. O exato mecanismo molecular de sinalização intracelular, que é mediado pelo receptor da insulina e que resulta em diversas respostas biológicas, foi apenas parcialmente elucidado nesse modelo de desnervação (BERTELLI et al., 2003).

Segundo Turinsky (1987), o efeito da desnervação no metabolismo muscular é influenciado pela população de fibras musculares e o fenômeno da desordem metabólica provocada pela desnervação inicia-se entre 3 a 6 horas após a secção do nervo. A interrupção do nervo que supre os músculos esqueléticos resulta no desenvolvimento da resistência à insulina, mostrada primeiramente por Buse e Buse (1959). Assim, a desnervação passou a ser um modelo tecido-específico de resistência à insulina, uma vez que os sinais da resistência ao hormônio ocorrem somente na musculatura desnervada, sendo o músculo da pata contralateral utilizado como controle (BERTELLI et al., 2003).

Vários estudos sobre desnervação da musculatura esquelética e seu efeito sobre o metabolismo da glicose vem sendo feitos no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos no metabolismo e resistência a glicose. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da desnervação da musculatura esquelética sobre a secreção da insulina e a homeostase glicêmica. Este estudo traz uma contribuição no que se refere à secreção de insulina *in vitro* de animais submetidos a desnervação do músculo sóleo e o efeito desta desnervação na homeostase glicêmica.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 3 a 5 meses fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, SP. Os animais tiveram livre acesso ao alimento (ração Purina para roedores) e à água “*ad libitum*”, sendo submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12h à temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C. Os animais foram tratados de acordo com o Guide for care use of laboratory animals (National Research Council, 1996).

Para a desnervação, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico, (Thiopental, ABBOTT, SP), na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal e tricotomizados na porção posterior das coxas por onde uma porção do nervo ciático, de aproximadamente 1 cm, da pata direita foi seccionada e retirada, segundo o modelo de desnervação proposto por Coderre et al, 1992.

Os ratos foram divididos em quatro grupos; controle: animais intactos; desnervado 3 dias: animais analisados após 3 dias da desnervação; desnervado 7 dias: animais analisados após 7 dias da desnervação e desnervado 28 dias: animais analisados 28 dias após a desnervação. Numa primeira serie de experimentos, o metabolismo da glicose no músculo sóleo isolado foi verificado após sacrifício dos animais por decapitação, em repouso. O músculo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25 – 35 mg foram primeiro incubadas por 30 min a  $37^\circ$  C em banho Maria de Dubinoff (FANEN, MODELO 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%; HEPES 6,64 mM; KCl 0,032%  $\text{CaCl}_2$  1,14 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,015%;  $\text{NaHCO}_3$  0,19%;  $\text{MgSO}_4$  0,03%) equilibrado com a mistura de 95%  $\text{O}_2$  – 5%  $\text{CO}_2$ , pH 7,4. Após este período, a fatia muscular foi transferida para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [ $\text{U}^{14}\text{C}$ ] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2DG, 0,5  $\mu\text{Ci/mL}$ ) e insulina (100  $\mu\text{M/mL}$ ). Dentro do frasco externo, foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700 $\mu\text{L}$  de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana

de borracha redonda através de uma pequena abertura nessa última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa de plástico, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema, contendo as fatias de músculo, foi incubado em banho Maria de Dubinoff por 60 min. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO<sub>2</sub> foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e o CO<sub>2</sub> foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37°C. O lactato produzido foi determinado pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C do meio de incubação do frasco externo, depois da separação do substrato usando coluna de troca iônica Dowex-2. A incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no precipitado obtido durante o processo de extração do glicogênio muscular (SJORGREEM et al., 1938). A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup>C no líquido contido no frasco interno. A captação da glicose (2DG) foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do <sup>3</sup>H+. Toda a medição da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno.

Numa segunda série de experimentos, as ilhotas pancreáticas foram isoladas seguindo-se técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (1965), aplicada a pâncreas murino por LACY & KOSTIANOVSKY (1967), com as modificações introduzidas por BOSCHERO, DELATRE & SANTOS (1981) e SUTTON et al.,(1986). Em cada experimento, um a três ratos foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 mL da solução de HANKS (HANKS), contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando, por fluxo retrogrado, a divulsão do tecido

acinoso. Procedeu-se, então a ablação do pâncreas, que foi transferido para tubo de ensaio de vidro (12 × 2 cm) e incubado por cerca de 18 min a 37 °C.

Em seguida, ainda a 37°C, o conteúdo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em béquer. Após mistura com HANKS (ca. 80 mL), foi lentamente aspirado e ejetado com seringa (3x ca. 50 mL) e, decantado durante 3 min. O sobrenadante foi então descartado, e o sedimento ressuspenso em HANKS (ca. 80 mL). Após repetir essa operação por quatro vezes, o produto final foi transferido para placa de Petri, de onde, sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos quatro grupos experimentais, foram coletadas alternadamente (grupo de quatro) em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 mL da solução-tampão de KREBS-RINGER suplementada com albumina bovina, à qual adicionou-se glicose ( 5,6 mM). Após incubação por 45 min (pré-incubação), a 37°C em atmosfera de carbôgenio pH 7,4, a solução de KREBS foi substituída por 1,0 mL do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose; 2,8 (G2,8); 5,6 (G5,6); 8,3 (G 8,3); 16,7 (G 16,7) mmol/L. Procedeu-se a nova incubação , por 90 min, nas condições referidas acima. Após este período, as placas foram colocadas em freezer (-20) por 10 min e, o sobrenadante, de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservados a -20 °C, até o momento da dosagem da insulina secretada.

A insulina plasmática e a secretada durante o período de incubação por ilhotas isoladas foram avaliadas de acordo com o método descrito por HERBERT, (1965), modificado por SCOTT et al.,(1981).

Em série separada de experimentos, usando ratos nas mesmas condições das séries anteriores, a tolerância à glicose em vivo foi avaliada através do teste de tolerância à glicose intravenosa (gttiv). Animais de todos os grupos receberam glicose, injetada na veia peniana na concentração de 0,5g/mL na dose de 1g/Kg de peso corporal. Amostras de sangue (100 µl) foram coletadas a partir da veia femoral em seringas de 1 mL antes (tempo 0) e após 5:00, 10:00, 20:00, 40:00 e 80:00 (min:s) da administração da glicose,

para determinação da glicose sérica. O teste de tolerância à glicose, foi calculado de acordo com LUNDBAEK (1962) utilizando-se o programa de computador ORIGIN® 6.0. Após o término do gttiv, alíquotas do tecido hepático e muscular (músculo sóleo) dos grupos foram transferidas para tubos de centrifuga (15mL) e, a seguir, digeridos com KOH 30% em banho fervente. Decorrido a digestão, adicionou-se 0,2 e 0,1 mL da solução de sulfato de sódio saturada no tecido hepático e muscular, respectivamente. Em seguida adicionou-se 7 mL de etanol no tubo contendo o tecido hepático e 3,5 mL no tubo do tecido muscular. Os tubos foram agitados e, a seguir, centrifugados a 2500 rpm durante 5 min. Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante e resuspendeu-se o conteúdo restante com água destilada para procedimento de avaliação do glicogênio por colorimetria com fenol e ácido sulfúrico ( LO SIU et al., 1970).

A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância seguida do teste de Tukey, onde apropriado. Em todos os casos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Na primeira série de experimentos, observou-se redução significativa da captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 7 dias, em relação ao grupo controle (figura 1). Por outro lado, não houve diferenças significativas na pata desnervada após 3 e 28 dias em relação ao grupo controle. A captação de glicose foi também avaliada no músculo sóleo da pata contralateral dos grupos controle e desnervado após 3, 7 e 28 dias. Os resultados mostraram que não houve alteração na pata contralateral intacta dos animais desnervados após 3 e 7 dias. Em contrapartida, verificou-se aumento significativo na captação da glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral do animal desnervado após 28 dias em relação ao animal controle (figura 1).

A seguir avaliamos a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de ratos dos quatro diferentes grupos, e incubadas na presença de concentrações crescentes de glicose (2,8 mM, 5,6 mM, 8,3mM e 16,7 mM)(figura 2). Não houve diferença significativa na secreção da insulina por ilhotas isolada sob as concentrações de 2,8mM e 5,6mM de glicose em relação aos quatro grupos. Em contra partida, houve um aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose nas concentrações de 8,3mM e 16,7mM no grupo desnervado após 28 dias em relação ao grupo controle, indicando um aumento da sensibilidade à glicose. Por outro lado, não houve alteração na secreção da insulina nas concentrações de 8,3mM e 16,7mM dos grupos desnervados após 3 e 7 dias em relação ao controle (figura 2).

Após a confirmação da sensibilidade da ilhota de Langerhans aos procedimentos de desnervação do músculo esquelético, realizamos outra série de experimentos para efetuar o teste de tolerância à glicose intravenosa nos grupos. Os resultados do teste foram avaliados pela estimativa da área sob as curvas de glicose sérica. Não foi constatada nenhuma alteração significativa diferente entre os grupos (figura 3).

O tecido hepático e muscular tem importância excepcional no metabolismo da glicose, e por esta razão, verificamos os teores hepáticos e muscular de glicogênio após o teste de tolerância à Glicose intravenosa,

visando avaliar os efeitos da glicose exógena. Os resultados mostraram uma variação não significativa nos estoques de glicogênio hepático dos quatro grupos analisados (figura 4).

O músculo sóleo teve seus estoques de glicogênio diminuídos após a sobrecarga de glicose intravenosa em ambas as patas, desnervada e íntegra, no grupo desnervado após 28 dias em relação ao controle. Foi observada diminuição dos estoques de glicogênio na pata desnervada em relação ao controle do grupo desnervado após 7 dias (figura 5).

## DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos que a houve variação na captação da glicose no músculo sóleo induzida pelo hormônio insulínico. Animais após 7 dias de desnervação, tiveram a captação de glicose diminuída pelo músculo sóleo da pata desnervada. Em contrapartida, a pata contralateral permaneceu com valores próximos aos da pata do animal controle. Esta diminuição da captação da glicose pelo músculo após 7 dias de desnervação, está relatada na literatura. Estudos demonstraram diminuição da captação de glicose na musculatura esquelética de ratos desnervado após 3 dias e 7 dias (TURINSKI, 1987, HIROSE et al., 2001, TURINSKY & DAMRAU-ABNEY, 1998, NUNES & MELLO, 2005(fase de impressão)). O mecanismo pelo qual ocorre a diminuição na captação de glicose em músculos patas desnervados por 3 e 7 dias está relacionado, em parte, à alteração dos mecanismos internos da cascata de reações químico-enzimáticas que culminam na translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (BERTELLI et al., 2003 e HIROSE et al., 2001). Não houve alteração na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervada após 28 dias. Por outro lado, a captação de glicose pelo músculo sóleo da pata contralateral desse mesmo grupo foi significativamente maior do que a pata do controle intacta. Davis & Karl, 1988, verificaram em ratos que o transporte de glicose no músculo esquelético desnervado na presença de insulina reduzia-se entre o 3º e 7º dia de desnervação, aumentava após 7 dias e aumentava ainda mais ao 10º dia de desnervação. A redução no transporte da glicose em resposta à insulina entre o 3º e o 7º dia de desnervação sugere resistência à insulina no músculo esquelético desnervado, com um retorno da resposta normal à insulina a partir do 10º dia desnervado (DAVIS, T.A. & KARL, I. E, 1988).

Desnervação inibe múltiplos aspectos do metabolismo da glicose na musculatura esquelética, além da captação entre eles, incorporação da glicose em glicogênio, conteúdo da glicose-6-fosfato e atividade da enzima glicogênio sintase (BURANT et al., 1984). Essas mudanças têm sido atribuídas às perdas do fator trófico derivado do nervo e/ou da estimulação elétrica pelo nervo (DAVIS, T. A. & KARL, I.E., 1988).

O músculo esquelético tem um papel essencial na manutenção da homeostase glicêmica (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987). No entanto, a variação das concentrações da glicose na corrente sanguínea é o fator mais importante na indução da secreção da insulina pela célula beta pancreática (HABER et al., 2001). A desnervação da musculatura esquelética altera a dinâmica de captação periférica da glicose podendo influenciar a concentração da glicose na corrente sanguínea e, com isso, afetar o processo secretório na célula beta pancreática.

Analizamos então a secreção da insulina de ilhotas de Langerhans isoladas dos grupos experimentais sob concentração crescente de glicose. O aumento de secreção de insulina no grupo desnervado após 28 dias nas concentrações 8,3 mM e 16,7mM, em relação ao grupo controle mostra um aumento de sensibilidade da ilhota a concentrações elevadas de glicose. A resistência à insulina observada em músculo desnervado desenvolve-se rapidamente pela diminuição do transporte de glicose estimulado pela insulina observado em poucas horas após ter sido desnervado (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987, WILKES, J., and BONEM A., 2000). No entanto, a expressão de GLUT-1 na membrana celular de animais submetidos a desnervação da musculatura esquelética é aumentada. Este aumento ocorre devido à inibição da proteína quinase C a qual favorece o aumento da expressão do GLUT-1. O aumento de transportadores GLUT-1 na membrana da célula muscular, é uma importante tentativa de melhorar a captação da glicose e restabelecer a homeostase glicêmica. No entanto, esta tentativa de aumentar a captação da glicose pelo músculo através do GLUT-1 não é suficiente para restabelecer a homeostase glicêmica local ante a desnervação (HUNTER et al., 2002, Bosch et al., 2003, GASTER et al., 2000 ).

A tentativa de restabelecimento da homeostase glicêmica parece ser complementada pelo aumento da sensibilidade das células B a glicose o que facilita a secreção do hormônio. A resistência a insulina causado pela desnervação é caracterizada pela diminuição dos transportadores de glicose 4 (Glut 4), como também a diminuição de processo enzimático intracelulares que culminam no transporte da glicose. Sendo a glicose o principal secretagono do

hormônio insulínico, avaliamos in vivo a tolerância através do teste de tolerância a glicose intravenosa e os conteúdos de glicogênio hepático e muscular após o gttiv. Não houve alteração nos valores da área sob a curva de glicose sérica durante o gttiv. Isso indica preservação da homeostase glicêmica. O Conteúdo do glicogênio hepático após a sobrecarga intravenosa de glicose, também não foi afetado. No entanto, o conteúdo de glicogênio do músculo sóleo de ambas as patas do grupo desnervado após 28 dias como a pata desnervada após 7 dias foram diminuídas. Estes resultados mostram que alterações no metabolismo da glicose no músculo sóleo são mais conflitantes e intrigantes já que a pouca literatura existente com relação ao metabolismo da glicose muscular de ratos desnervado acima de 20 dias são inexistentes.

## **CONCLUSÃO**

Resumidamente, o conjunto de resultados do presente estudo é indicativo de que a desnervação do músculo esquelético além de provocar alterações locais no metabolismo da glicose produz alterações em outros tecidos. Essas alterações incluem aumento da sensibilidade das ilhotas de langerhans a concentrações de glicose acima dos basais. Essa alteração observada nas ilhotas pode ser útil na preservação da homeostase glicêmica. Os mecanismos envolvidos nessa interação precisam ser investigados.

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Clarice Y. Sibuya, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio pela assistência técnica e as fundações Brasileiras de suporte financeiro a pesquisa: FAPESP, CNPq e Capes.

## REFERÊNCIAS

BERTELLI, D.F.; UENO, M.; AMARAL, M.E.; TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; CARVALHO, C.R.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A. C. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*, Apr;284(4):E679-87, 2003.

BOSCH, R.R.; BAZUINE, M.; WAKE, M.M.; SPAN, P.N.; OLTHAAR, A.J.; SCHURMANN, A.; MAASSEN, A.J.; HERMUS, A.D.R.M.M.; WILLEMS, P.H.G.M. AND SWEEP, C.G.J. Inhibition of Protein Kinase C $\beta$ II Increases Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes through Elevated Expression of Glucose Transporter 1 at the Plasma Membrane. *Molecular Endocrinology* 17(7): 1230 - 1239. 2003.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. *Arq Brás Endocrinol Metabo* 40: 149 – 155, 1996.

BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E.; SANTOS M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomicin. *Hormone Metabolism Research*, Sep;13(9):531-2, 1981.

BURANT, C.F.; LEMMON S.K.; TREUTELAAR, M.K.; BUSE, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. *American Journal Physiology*, Nov;247(5 Pt 1):E657-66, 1984.

BUSE, M.G.; BUSE, J. Glucose uptake and response to insulin of the isolated rat diaphragm: the effect of denervation. *Diabetes* ; 8:218-25. 1959.

DAVIS, T. A. & KARL, I. E. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in desnervated muscle. *Biochemistry J.* 254, 667-675, 1988.

GASTER, M.; FRANCH, J.; STAEHR, P.; BECK-NIELSEN, H.; SMITH, T.; SCHRODER, H.D. Induction of GLUT-1 protein in adult human skeletal muscle fibers. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism.* 2000 Nov;279(5):E1191-5, 2000.

HERBER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Secreção de Insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por Ácido graxos. *Arq Bras Endócrinol Metab* Vol 45 nº 3: 219 – 227, 2001.

HERBERT, V.; LAV, K. S.; GOTTLIER, C. W. & LEICHER, S. P. Coated charcoal immunoassay of insulin. *Journal Clinical Endocrinology.*, 25:1375 – 1384, 1965.

HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H.; YASUHARA, S.; IEBUNJO, C.; MARTYN, J.A.; IEBUNJO, C. Long-term denervation impairs insulin receptor

substrate-1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism*. Feb;50(2):216-22, 2001.

HUNTER, R.B.; STEVENSON, E.; KONCAREVIC, A.; MITCHELL-FELTON, H.; ESSIG, D.A.; KANDARIAN, S.C. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J*. Apr;16(6):529-38, 2002.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, Jan;16(1):35-9, 1967.

LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal Applied Physiology*, Feb;28(2):234-6, 1970

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* :5291;1507 – 1513. 1962.

MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol*. Jun;44:342-53, 1965.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory*. National Academy Press, Washington, DC, USA.

NUNES, W.M.S.; MELLO, M.A.R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. (impress), 2005.

RADOSAVLJEVIC, T.; TODOROVIC, V.; SIKIC, B. Insulin secretion: mechanisms of regulation. *Med Pregl*. May-Jun;57(5-6):249-53 2004.

PERALES, M.A.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: the glucose-6-phosphatase riddle. *Mol Cell Biochem*. Feb 27;101(1):67-71, 1991.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetology*, Nov;21(5):470-5, 1981.

SINACORE, D.R.; GULVE, E.A. The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy. *Phys Ther*. Dec;73(12):878-91, 1993.

SJORGREEM, B.; NORDENSKJOLD, D.T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. *Pfluger Arch Gesante Physiol Menschen Tiere*, 240;247, 1938.

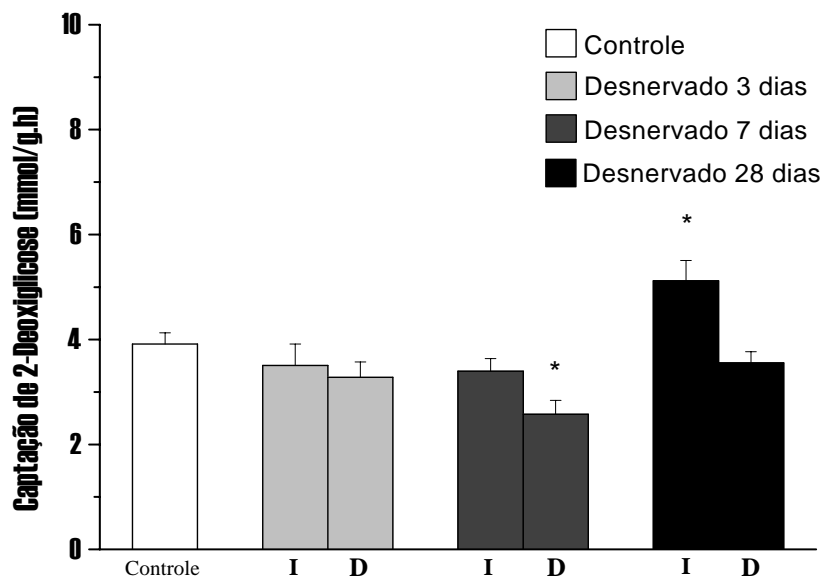
SUTTON, R.; PETERS, M.; MCSHANE, P.; GRAY, D.W.; MORRIS, P.J.  
Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase.  
Transplantation, Dec;42(6):689-91, 1986.

TURINSKY, J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast  
muscles in vivo. Am J Physiol ;252:R531-7, 1987.

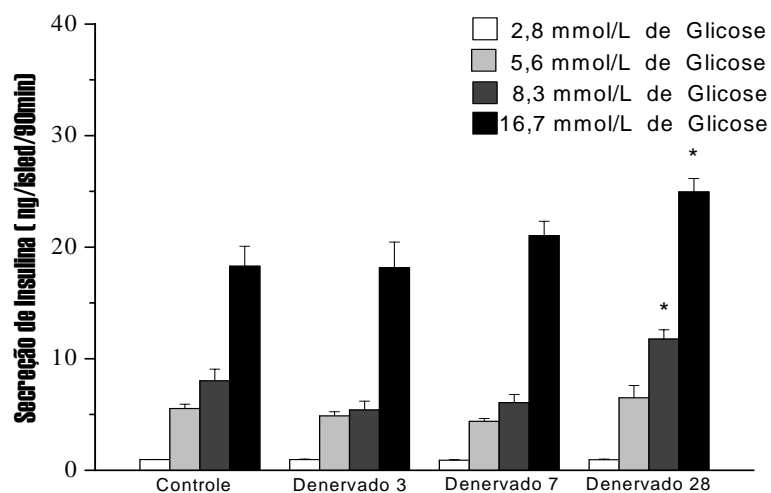
TURINSKY, J.& DAMRAU-ABNEY, A. Akt1 kinase and dynamics of insulin  
resistance in denervated muscles in vivo. American Journal Physiology,275  
(5pt2):R1425 – R1430, 1998.

WALLBERG-HENRIKSSON, H. Glucose transport into skeletal muscle.  
Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus.  
Acta Physiology Scand., 131, Suppl. 564: 1-80, 1987.

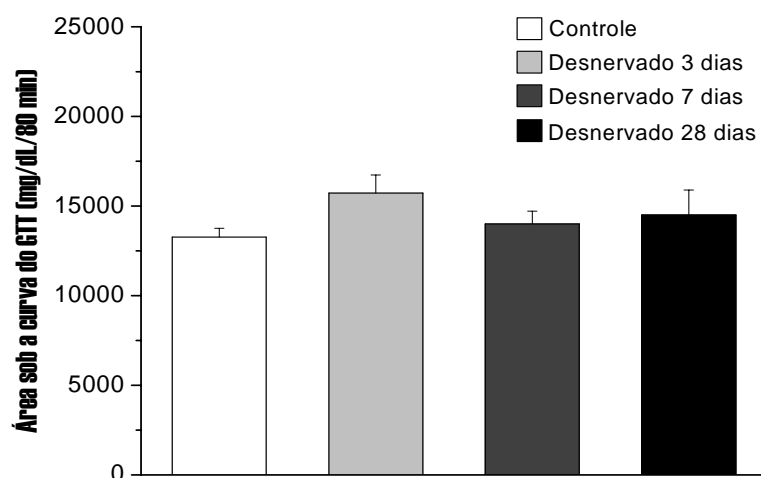
## FIGURAS



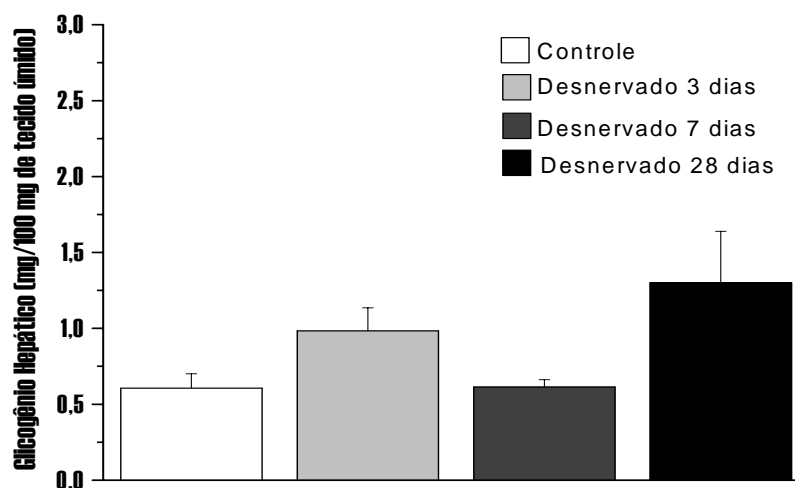
**Figura 1:** Captação de glicose pelo músculo sóleo isolado (média  $\pm$  erro padrão) de ratos de todos os grupos. O sinal (D) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal (I) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 7$  a 10 fatias musculares por grupo.



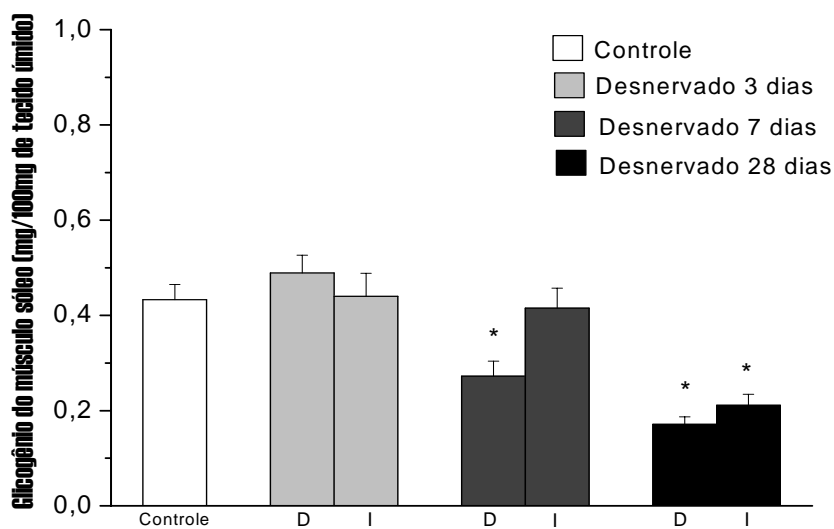
**Figura 2:** Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de ratos de todos os grupos e incubadas em presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,6 e 16,7 mmol/L) Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $P < 0,05$  em relação ao controle. ( $n = 6$ )



**Figura 3:** Área sob a curva da glicose sérica durante o teste de tolerância à glicose. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 5$  a 10 ratos por grupo.



**Figura 4:** Teor de glicogênio hepático (média  $\pm$  erro padrão) após 60 minutos da administração da Glicose (1mL/Kg), via intravenosa a animais de todos os grupos. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 5$  a 10 ratos por grupo.



**Figura 5:** Teor de glicogênio pelo músculo sóleo (média  $\pm$  erro padrão) de ratos de todos os grupos. O sinal (D) refere-se à pata desnervada enquanto que o sinal (I) refere-se à pata contralateral íntegra dos mesmos animais. Controle refere-se a animais íntegros. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\*) Diferença significativa,  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.  $n = 10$  a 19 fatias musculares.