

**Armando Ribeiro Florido Neto**

**O exercício físico é capaz de melhorar expressão de  
AMPK e GLUT4 em músculo esquelético de ratos  
alcoolistas e/ou tabagistas.**



**Presidente Prudente  
2015**

**Armando Ribeiro Florido Neto**

**O exercício físico é capaz de melhorar expressão de AMPK e GLUT4 em músculo esquelético de ratos alcoolistas e/ou tabagistas.**

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

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

Processo FAPESP nº 2013/10564-9

**Presidente Prudente  
2015**

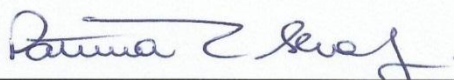
## FICHA CATALOGRÁFICA

F66e Florido Neto, A. R.  
O exercício físico é capaz de melhorar expressão de AMPK e GLUT4 em músculo esquelético de ratos alcoolistas e/ou tabagistas / Armando Ribeiro Florido Neto - Presidente Prudente: [s.n], ano 2015  
37 f.

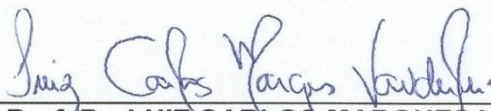
Orientador: Patrícia Monteiro Seraphim  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Inclui bibliografia

1. Álcool. 2. Tabaco. 3. Exercício Físico. 4. Sensibilidade à Insulina. 5. Glut4. 6. AMPK. I. Seraphim, Patrícia Monteiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM  
(ORIENTADORA)



Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES VANDERLEI  
(FCT/UNESP)



Prof. Dra. RENATA CALCÍOLARI ROSSI E SILVA  
(UNOESTE)

  
ARMANDO RIBEIRO FLORIDO NETO

PRESIDENTE PRUDENTE/SP, 08 DE JUNHO DE 2015.

RESULTADO: Aprovado

## DEDICATÓRIA

---

A Deus que me possibilitou e guiou meu caminho para estar aqui, aos meus pais Sidney Ribeiro Florido e Eliana Ap. Zanutto Florido que sempre estão e estiveram do meu lado me apoiando nas minhas decisões e dando coragem e incentivo a prosseguir, a minha mulher Janaina H. I. Santos Florido que me apoiou e me ajudou nos momentos difíceis estando do meu lado me dando amor e carinho e a minha filha Sofia Lima Santos Zanutto Florido que mesmo sem entender apenas o simples sorriso e a brincadeiras também contribuíram para que eu seguisse em frente e para finalizar a FAPESP pelo subsídio e a confiança depositada.

## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de agradecer a todos àqueles que me apoiaram e colaboraram e, de alguma maneira, foram importantes nessa fase da minha jornada:

Primeiramente quero agradecer a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo(FAPESP), que confiou no projeto apresentado e no meu potencial, me subsidiando, permitindo ser possível realizar as análises propostas no estudo com o numero de processo 2013/10564-9;

Agradecer aos meus pais Sidney Ribeiro Florido e Eliana Ap. Zanutto Florido, pelo apoio desde 2008, sempre estiveram ao meu lado, fazendo o possível e o impossível quando o mundo parecia ruir, companheiros de horas boas e ruins e que sempre me levantaram quando era mais fácil deixar caído, quero de deixar registrado que vocês são em quem me espelho. Tudo só foi possível graças a vocês;

A minha orientadora, Dr. Patricia Monteiro Seraphim, primeiramente pelo seu voto de confiança ao me franquear em seu laboratório, pela sua cumplicidade, amizade, e pela sua paciência em algumas horas. Companheira de churrascos e também “puxões de orelha”, mas com que sempre pude contar em horas boas ou ruins, espero cultivar nosso vinculo durante muito tempo;

Aos amigos membros do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFIS) Lucas Agostini, Rafael Junges, Marcelo Conrrado, Laís Regina, Carol Rippi, Thais Dutra, meu muito obrigado pela ótima convivência, risos e brincadeiras;

E um agradecimento em especial a todos os professores que me disseram não e me obrigaram a crescer;

Em especial agradecer a minha esposa Janaina que esteve junto em todos os momentos, me dando apoio e forças para continuar, Te amo, e a minha filha Sofia pelos momentos de brincadeiras e risadas que me faziam mais alegres e me dava coragem para enfrentar as dificuldades.

„Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível“.  
*Charles Chaplin*

<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2-METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
2.1-Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro.....	15
2.2-Protocolo de Ingestão de álcool.....	16
2.3-Protocolo Experimental de Exercício Físico.....	16
2.4-Composição Corporal .....	17
2.5-Teste de Tolerância à Insulina .....	17
2.6-Teste de Tolerância à Glicose (TTG).....	17
2.7-Coleta do material.....	17
2.8-Quantificação do RNAm dos genes Slc2a4, Prkaa2 e do Gapdh: .....	17
2.9-Quantificação de Proteínas.....	18
<b>3-TRATAMENTO ESTATÍSTICO</b> .....	<b>19</b>
<b>4-RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
<b>5-DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>6-REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Análise semanal do ganho de peso corpóreo.....	20
Figura 2: Análise da Constante de Decaimento de Insulina (kITT).....	22
Figura 3: Análise do Teste de Tolerância à Glicose (TTG).....	23
Figura 4A: Análise de expressão genica de mRNA do gene Prkaa2.....	24
Figura 4B: Análise de expressão proteica da proteína AMPK.....	24
Figura 5A: Analise da expressão gênica do SLC2A4 no músculo esquelético gastrocnemio.....	26
Figura 5B: Análise de expressão proteica da proteína transportadora de glicose GLUT4.....	26

## **LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1: Caracterização dos animais .....	21
--	----

**O exercício físico é capaz de melhorar expressão de AMPK e GLUT4 em músculo esquelético de ratos alcoolistas e/ou tabagistas.**

**Physical exercise is able to improve expression of AMPK and GLUT4 in skeletal muscle of rats alcoholics and/or smokers.**

Armando Ribeiro Florido Neto<sup>1</sup>; Lucas Agostini<sup>1</sup>; Ana Caroline Rippi Moreno<sup>1</sup>; Ana Carolina Panveloski Costa<sup>2</sup>; Maria Tereza Nunes<sup>2</sup>; Patrícia Monteiro Seraphim<sup>1</sup>.

1. Departamento de Fisioterapia, Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.

2. Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Fisiologia Endócrina: Regulação Hormonal e Expressão Gênica, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

**Correspondência:** Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim – Departamento de Fisioterapia – Laboratório GPFis, Bloco III – FCT / UNESP – Rua Roberto Simonsen, 305 – Centro Educacional – CEP: 19060-900 – Presidente Prudente – SP – Email: patricia@fct.unesp.br

**Resumo**

Álcool e cigarro são as drogas psicoativas lícitas mais consumidas no mundo, sendo na maioria das vezes, consumidas em associação. Alterações metabólicas estão associadas com consumo de álcool e cigarro, envolvendo prejuízos na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo celular. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a prática regular de exercício físico pode ter efeitos positivos sobre possíveis alterações encontradas na expressão de proteínas do metabolismo celular, GLUT4 e AMPK, em músculo esquelético de ratos tabagistas e/ou alcoolistas. Foram utilizados 80 ratos Wistar, divididos em 8 grupos C: controle, F: fumante, A: alcoolista, FA: fumante alcoolista, CE: controle exercitado, FE: fumantes exercitado, AE: alcoolista exercitado, FAE: fumantes alcoolista exercitado. Grupos de fumantes foram expostos à combustão de quatro cigarros, 1h/dia, 2x/dia, 5x/semana durante 60 dias. Uma mistura de 10% v/v de etanol absoluto e água foi oferecida aos grupos alcoolistas. Grupos exercitados realizaram treinamento em esteira 5x/semana, 1h/dia, 10m/min, durante 60 dias. Teste de Tolerância à insulina, Teste de Tolerância a Glicose foram realizados para avaliação da sensibilidade à insulina. RT-PCR foi utilizada para a quantificação dos genes Slc2a4 (GLUT4) e Prkaa2 (AMPK) e para a quantificação do conteúdo proteico de GLUT4 e AMPK foi usada a técnica de Western blotting. Anova one-way e teste t-Student foram utilizados para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos. Valores de p inferiores a 5% foram considerados significativos. Os grupos F, A e FA apresentaram uma redução no peso ( $P < 0,05$ ), sendo que os grupos FE, AE e FAE apresentaram um ganho de peso normal frente comparados aos demais grupos. O consumo de ração, índice de Lee e peso do músculo gastrocnêmio foram reduzidos nos grupos F, A e FA (~20%) em comparação ao C, sendo revertido pelo exercício físico imposto. Apenas os grupos que receberam a intervenção do álcool mostraram uma redução no KITT, mesmo com o treinamento. Valores de expressão gênica de Prkaa2 e Slc2a4 foram menores ( $P < 0,05$ ) em nos grupos F, A e FA, retornando a valores normais quando exercitados. Já o conteúdo proteico de GLUT4 e de AMPK aumentou em alcoolistas e fumantes/alcoolistas. O exercício físico promoveu aumento de AMPK em todos os

grupos exercitados, independentemente da intervenção. Interessantemente não se observou correlação entre conteúdo de mRNA e de proteína AMPK e GLUT4. O uso de álcool e / ou do tabaco foi prejudicial à ingestão calórica, sensibilidade à insulina e expressão de proteínas AMPK e GLUT4. A prática regular de exercício físico moderado contribui para melhorar todas as alterações encontradas com o uso de álcool e da exposição à fumaça de cigarro, aumentando/mantendo a quantidade da AMPK e de GLUT4 no músculo esquelético, proteínas importantes para o metabolismo local e homeostasia glicídica.

Palavras Chave: Álcool; Tabaco; Exercício Físico; Sensibilidade à Insulina; Glut4; AMPK

### **Abstract**

Alcohol and cigarettes are the lawful psychoactive drugs more consumed in the world, usually being consumed in association. Metabolic alterations are linked to alcohol consumption and tobacco use involving impairment in the expression of proteins related to cellular metabolism. The objective of this study was to evaluate if the regular physical exercise can promote positive effects on the possible impairment related to expression of GLUT4 and AMPK in the skeletal muscle of smoker and/or alcoholic rats. Eighty Wistar rats were divided into 8 groups C:control, S:smoker, A:alcoholic, SA: smoker alcoholic, CE: control exercised, SE: smoker exercised, AE: alcoholic exercised, SAE: smoker alcoholic exercised. Smoker groups were exposed to combustion of four cigarettes, 1h a day, 2x a day, 5x a week for 2 months. A mixture of 10% v/v of ethanol plus water was offered to alcoholic groups. Exercised groups were trained on a treadmill (vel=10 m/min) 5x a week, 1h a day, during two months. Insulin Tolerance Test, Glucose Test tolerance were performed for the insulin sensitivity evaluation. RT-PCR was used for quantification of genes Slc2a4 (codes GLUT4) and Prkaa2 (codes AMPK). Western blotting was used for protein content (GLUT4 and AMPK) analysis. One-way Anova and Student t-test were used to analyze the statistical differences among the groups. P values less than 5% were considered significant. S, A and SA groups showed a reduction in body weight ( $P < 0.05$ ), and SE, AE and SAE groups showed a normal weight gain compared to the others. Food consumption, Lee's index and gastrocnemius's weight were reduced in S, A and SA (~ 20 %) compared to C, which was reversed by physical exercise. Only the groups that received the intervention of alcohol showed a reduction in KITT, even after exercise. Prkaa2 and Slc2a4 levels were lower ( $P < 0.05$ ) in all groups with intervention, recovering normal values after exercise. GLUT4 and AMPK protein levels were increased in A and SA groups. The exercise promoted increase of AMPK protein content in all groups, independently on the intervention. Interestingly there was no significant correlation between the content of mRNA and protein for both proteins. The use of alcohol and/or tobacco was harmful to caloric intake, insulin sensitivity and expression of AMPK and GLUT4. Regular physical exercise contributed to improve all alterations observed with alcohol use and exposure to cigarette smoke, increasing/maintaining the AMPK and GLUT4 in the muscle, which are very important for local metabolism and glycidic homeostasis.

Keywords: Alcohol; tobacco; Physical Exercise; Insulin sensitivity; Glut4; AMPK

## 1 Introdução

O álcool e cigarro são as drogas psicoativas lícitas mais consumidas no mundo sendo na maioria das vezes consumidas em associação. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o uso abusivo de álcool é responsável por mais de 2,5 milhões de mortes anualmente, podendo causar mais de 60 diferentes tipos de doenças. Para o cigarro os dados apontam que mais de 5,5 milhões de pessoas morrem anualmente em consequência do seu uso crônico, sendo responsável por uma morte a cada 6 segundos<sup>1</sup>.

Pode-se observar que parâmetros bioquímicos (glicemia e colesterol) e parâmetros plasmáticos (triglicerídeos e lipoproteínas) também são alterados pelo consumo de álcool e cigarro. Estudos mostram que a hipoglicemia é comum em casos de intoxicação por álcool, sendo que seu uso crônico aumenta a glicemia entre os usuários<sup>2</sup>. Outros estudos em animais mostram que o uso diário de etanol em doses moderadas por 4 semanas, aumenta a concentração plasmática não apenas do colesterol HDL, mas também do colesterol LDL e dos triglicerídeos, sendo que em modelos de estudos com indivíduos fumantes, o tabagismo está relacionado também a um quadro de inflamação de baixo grau<sup>3</sup> e estresse oxidativo<sup>4</sup>, causado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias<sup>5</sup>.

A literatura aponta que o aumento de citocinas pró-inflamatórias tem efeito direto no desenvolvimento da resistência à insulina, interferindo na sinalização insulínica<sup>6-7</sup>. Outro fator importante é a geração de radicais livres (espécies reativas de oxigênio „EROS“)<sup>8,9</sup> pelo uso das duas drogas. Aumento de EROS leva à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear-kB (NF-kB) e proteína ativadora - 1 (AP-1), que são críticos para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>5</sup>.

Na literatura, estudos apontam participação importante do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da resistência insulínica e na patogênese do diabetes tipo 2, tais como bloqueador da ação da insulina inibindo a atividade tirosina-quinase da subunidade beta e da fosforilação do receptor de insulina (IRS-1), e na regulação do mRNA do GLUT4, atuando como inibidor da transcrição do gene do GLUT4, o

Slc2a4<sup>10</sup>. A redução da expressão do GLUT4 ou a alteração na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática de células adiposas e musculares está associada à resistência insulínica e alterações na via de sinalização insulínica, provocando menor ação da insulina, atrapalhando a homeostasia da glicose<sup>11,12</sup>.

A captação de glicose em músculo esquelético ocorre de duas maneiras principais: mediada pela insulina<sup>13</sup> e/ou mediada pela proteína AMPK (proteína cinase ativada por 5'-AMPc) que está ligada à atividade contrátil e ao exercício físico<sup>14</sup>. Em tecido muscular e adiposo, o processo de captação de glicose por difusão facilitada é estimulado pela insulina, quando ela se liga ao seu receptor específico favorecendo autofosforilação do receptor e ativando uma série de proteínas intracelulares, culminando na translocação de proteína transportadora de glicose GLUT4 para a membrana plasmática<sup>12,15</sup>.

A ativação da AMPK ocorre em função do decréscimo do estado energético celular. Na situação em que a relação AMP:ATP aumenta, ocorre uma mudança conformacional na molécula, deixando-a suscetível à fosforilação e ativação<sup>16</sup>, com as atividades físicas que exigem maiores concentrações de energia ativando essa via metabólica com mais eficiência<sup>17</sup>.

Assim, a realização de atividade física que seja capaz de potencializar a via da AMPK e seja eficiente em regular a homeostasia glicídica, aumentar a capacidade oxidativa e diminuir a síntese de marcadores inflamatórios pode ser considerada uma medida não farmacológica para o tratamento e/ou prevenção das patologias causadas pelo alcoolismo e tabagismo. Assim um primeiro objetivo do estudo foi avaliar efeitos regulatórios da ingestão de etanol e/ou exposição à fumaça de cigarro sobre a expressão de proteínas GLUT4 e AMPK em músculo esquelético de ratos submetidos à exposição à fumaça de cigarro e/ou ingestão de álcool a 10% v/v. Outro objetivo do estudo consistiu em avaliar se a prática regular de exercício físico pode ter efeitos positivos sobre possíveis alterações encontradas na expressão de GLUT4 e AMPK em ratos tabagistas e/ou alcoolistas.

## **2 Metodologia**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, Câmpus Presidente Prudente para realização, processo nº 1/2012, respeitando os aspectos éticos envolvendo animais

seguindo as resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

Oitenta ratos da linhagem Wistar pesando em torno de 250 gramas foram obtidos juntamente ao Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu, e permaneceram no Biotério II da FCT Unesp Câmpus de Presidente Prudente, em gaiolas plásticas (30 x 16 x 19 cm) coletivas. Esses animais permaneceram em grupos de 5 animais por gaiola, sob temperatura média de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12/12 h, com o ciclo claro iniciando-se às 7:00 h.

Os animais foram divididos randomicamente nos seguintes grupos: N: grupo composto por 10 ratos que não foram expostos à fumaça de cigarro, não foram submetidos à ingestão de álcool e não foram submetidos ao protocolo de exercício físico; F: grupo fumante, composto por 10 ratos que foram submetidos à exposição à fumaça de cigarro; A: grupo alcoolista, composto por 10 ratos que ingeriram álcool; FA: grupo fumante alcoolista, composto por 10 ratos que ingeriram álcool e foram expostos à fumaça de cigarro; E: grupo exercício, composto por 10 ratos que foram submetidos ao protocolo de exercício físico; FE: grupo fumante exercício, composto por 10 ratos que foram submetidos à exposição de fumaça de cigarro e ao protocolo de exercício; AE: grupo alcoolista exercitado, composto por 10 ratos que ingeriram álcool e foram submetidos ao protocolo de exercício físico; AFE: grupo alcoolista fumante exercitado, composto por 10 ratos que ingeriram álcool, foram expostos à fumaça de cigarro e foram submetidos ao protocolo de exercício físico.

Foi utilizado cigarro comercial, com a composição descrita a seguir: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarros, extratos vegetais, agentes de sabor, gerando para cada queima de cigarro o valor de 0,7 mg de nicotina, 8 mg de alcatrão e 9 mg de monóxido de carbono.

## **2.1 Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro**

O sistema de inalação que foi utilizado é o mesmo descrito por Cendon (1994), com adequações do espaço para gaiola e válvulas, realizadas pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Presidente Prudente - SP. Como câmara de inalação foi utilizada uma caixa, com estrutura de alumínio e vidro (100 x 44 x 44 cm), hermeticamente fechada e dividida em dois compartimentos por um tabique de vidro escuro com cinco pertuitos de uma polegada de diâmetro. Um dos compartimentos foi utilizado para a colocação de cigarros acesos em um suporte e o

outro, destinado à exposição de 5 animais dentro de uma gaiola. Na câmara de queima de cigarros, foi conectada uma fonte de ar comprimido com um fluxo de 10 l/min permitindo a combustão dos cigarros e a condução da fumaça para a câmara de exposição, que contem um orifício de drenagem de ar, por onde foi feita a exaustão da mistura. Desta forma, o arranjo experimental aproxima-se de uma situação de fumo passivo. A exposição à fumaça foi efetuada em duas fases: adaptação e experimental. A fase de adaptação compreendeu os cinco primeiros dias de experimentos em que os ratos foram expostos à fumaça de 2 cigarros por 10 minutos, uma vez ao dia. Já na fase experimental, os animais foram expostos à combustão de 4 cigarros, durante 30 minutos, duas vezes ao dia, cinco dias por semana, durante 60 dias.

## **2.2 Protocolo de Ingestão de álcool**

O preparo da solução de etanol foi feito com etanol 99,9% diluído em água até chegar à concentração desejada em 10%. A ingestão do etanol foi feita de modo que os ratos não tivessem outra fonte líquida na caixa a não ser a bebida com o etanol, sendo assim então só ofertado como bebida o etanol aos animais que ingeriram etanol, uma forma de assegurar que todos os animais da caixa estivessem bebendo. Para a ingestão da solução os animais passaram por um período de adaptação na qual a concentração de etanol aumentou de 5% v/v nos dois primeiros dias, 7,5%v/v nos dois próximos dias, até chegar à concentração experimental final de 10% v/v e assim permaneceu durante 60 dias<sup>18</sup>.

## **2.3 Protocolo Experimental de Exercício Físico**

O programa de exercício físico foi realizado em esteira rolante para animais de pequeno porte a uma velocidade de 10m/min. O protocolo de exercício físico também dividido em duas fases: adaptação e experimental. Na fase de adaptação os animais foram submetidos a sessões de treinamento com duração progressivamente 15, 30, 45, 60, minutos e compreendeu os cinco primeiros dias de experimentos. Na fase experimental os animais realizaram as sessões de exercício físico durante 60 minutos. As sessões foram realizadas cinco vezes por semana, durante sessenta dias, este protocolo de treinamento já foi utilizado em estudos anteriores, obtendo-se efeitos positivos sobre alguns parâmetros avaliados no modelo de exposição à fumaça de cigarro<sup>19</sup>.

## **2.4 Composição Corporal**

O peso corpóreo do animal foi verificado em balança analítica HOYLE modelo KST-131 com precisão de 1 grama e capacidade máxima de 5 quilogramas.

## **2.5 Teste de Tolerância à Insulina**

Os animais realizaram o teste uma semana antes do início do protocolo e uma semana antes de encerrar o protocolo de experimento, os animais foram mantidos 8 horas em jejum de água e comida, após o qual o sangue foi coletado por punção caudal correspondendo ao tempo “zero” (basal) do ensaio. Posteriormente foi administrada injeção intraperitoneal de insulina regular na dose de 1 UI / Kg de peso corpóreo sendo coletado sangue por punção caudal nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A glicemia foi mensurada em glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil).

## **2.6 Teste de Tolerância à Glicose (TTG).**

Os animais realizaram o teste uma semana antes do início do protocolo e uma semana antes de encerrar o protocolo de experimento, os animais foram mantidos 8 horas em jejum de água e comida, após o qual o sangue foi coletado por punção caudal que corresponderia ao tempo “zero” (basal) do ensaio. Posteriormente, foram administrados 1,5g glicose/Kg do peso corpóreo via intraperitoneal em solução a 20% de glicose em salina 0,9%. As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal nos tempos 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. A glicemia foi mensurada por glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil).

## **2.7 Coleta do material**

Os animais foram anestesiados 24 horas após a última sessão de treinamento via intraperitoneal com anestésico Thiopentax (tiopental sódico 60mg/kg peso corporal) e após perda dos reflexos córneos e de retirada da pata à dor o músculo esquelético gastrocnêmio foi removido para o estudo de expressão de proteínas e quantificação de RNAm dos genes escolhidos no estudo.

## **2.8 Quantificação do RNAm dos genes Slc2a4, Prkaa2 e do Gapdh:**

Para a quantificação do RNAm dos genes foi utilizada a técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*). O RNA total das amostras do

músculo gastrocnêmico foi isolado com Brazol (LGCBio Biotecnologia, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas pela absorbância a 260 nm. Para transcrição reversa, 5 µg de RNA total foram submetidos à reação de Transcrição Reversa ( MMLV-RT Transcrição Reversa; Ref:M1705; concentração 200U/µl; Promega Corporation ) com primers randômicos para a síntese de uma fita de cDNA , seguindo instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a amplificação utilizando enzima Gotaq DNA polimerase (Gotaq Green Master Mix; Ref. M1723; concentração: 1X; Promega Corporation) dos fragmentos dos genes: *Slc2a4* (Sense: 5'- CCCCTCCAGGGCAAAGGAT -3'; Antisense: 5'- TCCTGGAGGGGAACAAGA A - 3'; temperatura de anelamento: 54°C; ciclos: 33); *Prkaa2* ( Sense: 5'- AATAATGAACCA AGCCAGTG-3", Antisense: 5'- CTCCG CCATAATGTCGTATG -3"; temperatura de anelamento: 52°C; ciclos: 34 ); e *Gapdh* (Sense: 5"- GAA GGTGAAGGTCGGAGTC - 3"; Antisense: 5" - GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3"; temperatura de anelamento: 58°C; ciclos: 30), por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Os produtos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e visualizados com iluminação UV (Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc.). Para a análise densitométrica das bandas obtidas, utilizou-se o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), para Windows. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão da proteína desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH). Todo o ensaio foi realizado em termociclador automático marca Techne TC-312 país de fabricação Reino Unido.

## 2.9 Quantificação de Proteínas

A detecção das quantidades de proteínas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e quimiluminescência para detecção das bandas. Resumidamente, as amostras foram submetidas a um fracionamento em membranas totais do tecido muscular gastrocnêmio, homogeneizadas em tampão contendo: Sacarose 250mM; Hepes 20mM, EDTA 2mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) e centrifugados a 12.000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polietileno tipo eppendorf. A concentração de proteínas totais foi avaliada pelo método de Bradford. Quantidades iguais de

proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AmershamBiosciences, UK). Após bloqueio com albumina sérica bovina em PBS 8% durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-AMPK (Chemicon) (diluição 1:1000 em PBS) e anti-Glut4 (Chemicon) (1:1000 em PBS) durante 3 horas, a 37°C. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho), marcado com enzima peroxidase (HRP) (GE Healthcare, Amersham, UK), diluído 1:5.000 em solução bloqueadora durante 1 hora (5% de leite em pó desnatado+ 20 ml de PBS 1X + 0,05% de Tween 20). A membrana foi lavada vigorosamente com tampão PBS 1x e colocada em contato com 5mL da reação de quimiluminescência (Luminol 1,1%, Ácido. P-Cumárico 0,48%, Tris 1M (pH 8,5) 11,1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 2 minutos e, posteriormente exposta ao Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) para detecção das bandas resultantes. O filme foi fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as imagens foram analisadas por densitometria óptica utilizando-se o software Scion Image for Windows (Scion Corporation, EUA).

Os anticorpos anti-AMPK- $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 (Cell Signaling Technology, referencia: 2532) e anti-GLUT4 (Chemicon International, Temecula, Califórnia) utilizados consistiram em antissoro comercial de coelho.

### **3 Tratamento Estatístico**

Após a verificação da distribuição normal dos dados pela equação de Kolmogorov-Smirnov, como forma de estatística descritiva dos dados de composição corporal e bioquímicos coletados, foram utilizados valores de medidas de tendência central (valores de média) e de medidas de dispersão (desvios padrão). A análise de variância (ANOVA one-way) foi utilizada para analisar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias e seguidas do pós-teste de Tukey. Valores de probabilidade (p) inferiores a 5% foram considerados significantes estatisticamente e todos os dados da presente pesquisa foram processados e tratados no pacote estatístico SPSS for Windows, versão 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

#### 4 Resultados

Na Figura 1, pode-se observar a media da diferença de ganho de peso semanal corpóreo dos ratos, em que foi subtraído da avaliação atual o peso da primeira avaliação, restando apenas o peso de ganho por semana. São apresentados valores de média coletados ao longo dos 60 dias de intervenções. Pode-se verificar que o grupo F apresentou redução do peso corpóreo em torno de 33% ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo C e quando os fumantes receberam a intervenção da atividade física (FE) esse valor foi reduzido em 40% ( $P < 0,05$ ) em relação ao CE, com valor semelhante ao grupo F, já o álcool causou uma redução de 72% ( $P < 0,0001$ ) no ganho de peso corpóreo em relação ao C, e com a intervenção do exercício físico, houve aumento de 65% ( $P < 0,0001$ ). Quando analisamos a intervenção combinada verificou-se que o grupo FA produziu redução no ganho de peso de 113% comparado ao controle, e o exercício físico incrementou o ganho de peso em 132% ( $P < 0,0001$ ).

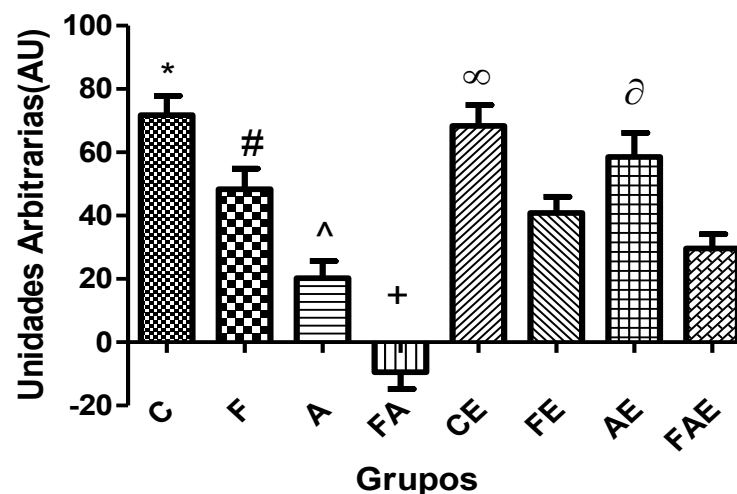


Figura 1: Análise semanal da media do peso corpóreo de ratos Wistar. Grupos Controle(C), Fumante (F), Alcoolista (A), Fumante Alcoolista (FA), Controle Exercício (CE), Fumante Exercício (FE), Alcoolista Exercício (AE), Fumante Alcoolista Exercício (FAE). \*  $p < 0,05$  vs F, A, FA; #  $p < 0,05$  vs A, FA; ^  $p < 0,05$  vs FA, AE; +  $p < 0,05$  vs FAE; ∞  $p < 0,05$  vs FE, FAE; ∂  $p < 0,05$  vs FAE. N=10.

Na Tabela 1 pode-se observar que todos os parâmetros avaliados se diferem entre os grupos. Para o peso do músculo gastrocnêmio o grupo F teve uma redução

de 15% ( $P < 0,05$ ), o grupo A também apresentou uma redução de 22% ( $P < 0,0001$ ) e o grupo FA também houve redução de 22% ( $P < 0,05$ ) na massa tecidual em comparação ao grupo C. O grupo AE apresenta aumento de 21% comparado ao grupo A e o grupo FAE também apresentou um aumento de 10% comparado ao grupo FA na massa tecidual. Em respeito ao Índice de Lee (IL - índice da massa corpórea para roedores) pode-se observar que os grupos F, A, FA apresentaram menor valor de IL comparados ao C ( $P < 0,0001$ ). Já o exercício promoveu aumento no IL em todos os grupos ( $P < 0,05$ ), independente das intervenções fumaça e/ou álcool. O consumo de álcool revelou um dado inesperado mostrando um aumento de 7% ( $P < 0,05$ ) no grupo AE comparado ao A e 32% ( $P < 0,05$ ) no grupo FAE comparado ao FA. O consumo de ração se diferenciou em todos os grupos comparados ao controle, o grupo F apresentou redução de 33% ( $P < 0,0001$ ), o grupo A apresentou redução de 30% ( $P < 0,0001$ ) e o grupo FA apresentou uma redução de 49% ( $P < 0,0001$ ). Já o exercício físico aumentou o consumo de ração em gramas em todos os grupos, com o grupo FE apresentando aumento de 53% ( $P < 0,0001$ ) frente ao F, o grupo AE apresentando aumento de 14% ( $P < 0,05$ ) no consumo de ração frente ao A e o grupo FAE apresentando um aumento de 62% ( $P < 0,0001$ ) frente ao FA. O grupo AE apresentou redução de 20% ( $P < 0,05$ ) do consumo de ração comparado ao CE, e o grupo FA aumentou em 37% ( $P < 0,05$ ) comparado ao FAE.

**Tabela 1: Caracterização dos animais.**

	Peso do músculo	Índice de Lee	Consumo álcool	Consumo ração
<b>Controle (C)</b>	3,30±0,47*	30,41±0,49*	-	28,13±1,04*
<b>Fumante (F)</b>	2,82±0,52^	28,59±1#	-	18,71±1,09#
<b>Alcoolista (A)</b>	2,57±0,47#	28,44±0,82\$	29,73±4*	19,59±1,73∞
<b>Fumante Alcoolista (FA)</b>	2,58±0,51∞	28,82±0,95+	21,11±3.87#	14,57±1,30+
<b>Controle Exercício (CE)</b>	3,12±0,47∂	29,77±0,38	-	27,98±1,21&
<b>Fumante Exercício (FE)</b>	3,28±0,61	30,21±0,92	-	28,72±1,74
<b>Alcoolista Exercício (AE)</b>	3,12±0,35	29,69±0,64	32,03±3,20	22,27±1,52
<b>Fumante Alcoolista Exercício (FAE)</b>	2,88±0,30	29,77±1,28	28,05±3,33	20,07±1,27

**Para o Peso do músculo gastrocnêmio:** \*  $p < 0,0001$  vs F, A, FA; ^  $p < 0,05$  vs FA, FE; #  $p < 0,05$  vs FA, AE; ∞  $p < 0,05$  vs FAE; ∂  $p < 0,0001$  vs AE, FAE. **Índice de Lee:** \*

$p < 0,05$  vs F, A, FA; #  $p < 0,05$  vs FE; \$  $p < 0,05$  vs AE; +  $p < 0,05$  vs FAE; **Consumo de Álcool:** -FAxA FAxFAE \*  $p < 0,05$  vs AE, FA; #  $p < 0,05$  vs FAE; **Consumo ração:** \*  $p < 0,0001$  vs F, A, FA ; #  $p < 0,0001$  vs FA, FE;  $\infty$   $p < 0,05$  vs FA, AE; +  $p < 0,0001$  vs FAE; &  $p < 0,0001$  vs AE, FAE.

Na Figura 2 são ilustrados os resultados da constante de decaimento da insulina (kITT), expressa em %/min, obtida a partir da realização do teste de tolerância à insulina. Na Figura 2 pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos controles e fumantes, sendo que o grupo alcoolista quando foi comparado ao grupo C houve uma diminuição de 31% ( $P < 0,05$ ) na sensibilidade à insulina. Quando associado ao exercício físico, o consumo de álcool reduziu mais ainda a sensibilidade com queda de 50% no grupo AE comparado ao A ( $P < 0,05$ ) e 62% quando comparado ao CE ( $P < 0,0001$ ), já para o grupo FAE apresentou uma redução de 73% ( $P < 0,0001$ ) na sensibilidade à insulina quando comparado ao grupo FA.

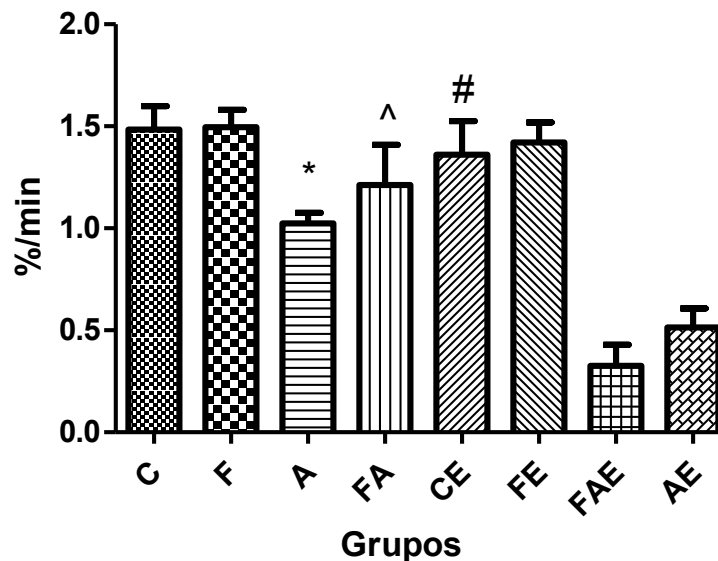


Figura 2 - Análise da Constante de Decaimento de Insulina (kITT) em ratos Wistar. Grupos Controle(C), Fumante (F), Alcoolista (A), Fumante Alcoolista (FA), Controle Exercício (CE), Fumante Exercício (FE), Alcoolista Exercício (AE), Fumante Alcoolista Exercício (FAE). \*  $p < 0,05$  vs C, AE; ^  $p < 0,0001$  vs FAE; #  $p < 0,0001$  vs AE, FAE. N=10.

Na Figura 3 tem-se o resultado do Teste de Tolerância à Glicose (TTG), com a avaliação da área sob a curva a partir dos valores de glicemia encontrados no teste. Não se observaram diferenças significantes entre os grupos avaliados.

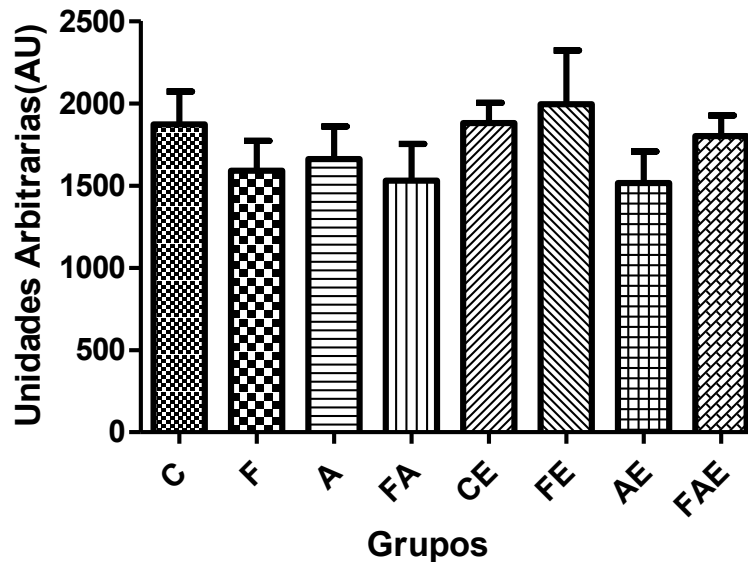
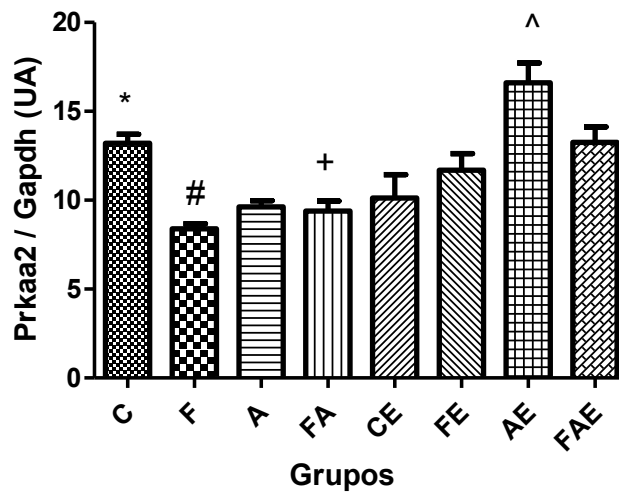


Figura 3 - Análise do Teste de Tolerância à Glicose (TTG) de ratos Wistar. Grupos Controle(C), Fumante (F), Alcoolista (A), Fumante Alcoolista (FA), Controle Exercício (CE), Fumante Exercício (FE), Alcoolista Exercício (AE), Fumante Alcoolista Exercício (FAE). Não há diferença estatística n=10.

Na Figura 4 são ilustrados os resultados da análise de expressão proteica da AMPK. Na Figura 4A, observam-se resultados da expressão de mRNA do Prkaa2, gene que codifica a proteína AMPK. Pode-se observar que o grupo F apresentou redução de 34% ( $P < 0,05$ ) na expressão do gene em relação ao C e que o grupo FE apresentou aumento de 26%, indicando o benefício do exercício nesta situação, a intervenção do álcool (grupo A) fez com diminuísse a expressão do Prkaa2 em 27% em relação ao grupo C ( $P < 0,05$ ), e o exercício (grupo AE) conseguiu reverter este quadro em 42% em relação ao grupo A ( $P < 0,05$ ), quando associamos as duas intervenções, o grupo FA apresentou uma redução de 29% na expressão do gene comparado ao grupo C, sendo que a intervenção do exercício (grupo FAE) apresentou uma melhora na expressão gênica da Prkaa2 em 29% ( $P < 0,05$ ) comparado ao grupo FA. Na Figura 4B observa-se o conteúdo proteico da AMPK. Quando comparamos o grupo C com o CE observa-se aumento de 67%, o mesmo fato ocorre quando comparamos o grupo F com o grupo FE, com aumento de 72%

( $P < 0,05$ ). Nos grupos alcoolista houve aumento no conteúdo proteico da AMPK em 68% ( $P < 0,05$ ) no grupo A em relação ao grupo C, e o grupo AE apresentou aumento de expressão comparado aos grupos C, CE e A ( $P < 0,001$ ), sendo que o mesmo foi observado no grupo FA para o conteúdo proteico de AMPK na vigência de exercício físico mostrando que o exercício foi capaz de reverter ou atenuar em 65% o quadro gerado.

A)



B)

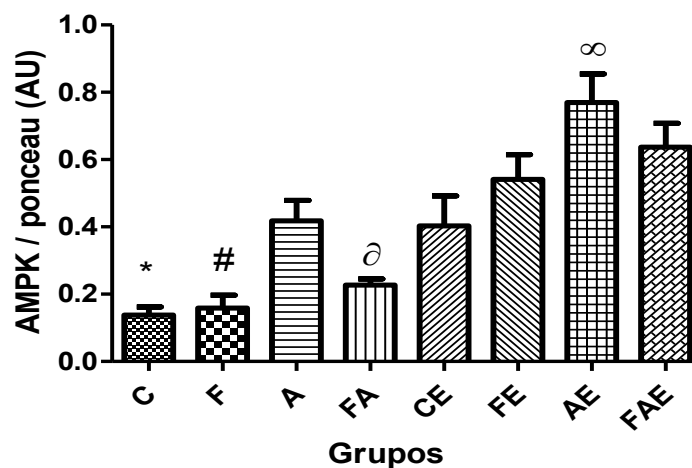


Figura 4 – Análise de expressão proteica da AMPK em músculo esquelético gastrocnêmio de ratos Wistar tabagistas e alcoolistas. Grupos: Controle(C), Fumante (F), Alcoolista (A), Fumante Alcoolista (FA), Controle Exercício (CE), Fumante Exercício (FE), Alcoolista Exercício (AE), Fumante Alcoolista Exercício (FAE). Em A) Análise da expressão gênica do Prkaa2. \*  $p < 0,05$  vs F, A, FA; #  $p < 0,05$  vs FE; ^  $p < 0,05$  vs A, CE; +  $p < 0,05$  vs FAE. N=10. Em B) Conteúdo de proteína AMPK corrigido por Ponceau expresso em unidades arbitrárias, \*  $p < 0,05$  vs A, CE; #  $p < 0,05$  vs FE, A; ∂  $p < 0,05$  vs FAE; ∞  $p < 0,05$  vs A, CE. N=7.

Na Figura 5 são apresentados os resultados da análise de expressão proteica do transportador de glicose GLUT4. Na Figura 5A tem-se a expressão de mRNA do gene decodificador da proteína GLUT4, o e pode-se observar que o grupo F apresentou redução de 47% ( $P < 0,05$ ) no conteúdo de mRNA de Slc2a4 comparado ao grupo C, e que a prática de exercício físico mesmo em fumantes promoveu aumento similar ( $P < 0,05$ ), em comparação no grupo A observa-se diminuição de 42% na expressão de Slc2a4 no grupo A em relação ao grupo C, já o exercício parece ter revertido esta situação, com o grupo AE apresentando aumento 44% ( $P < 0,05$ ) comparado ao A e similar aos grupos C e CE, resultados observados também quando analisamos o grupo FA que teve uma queda de 53% comparado ao controle, já o exercício teve o mesmo comportamento conseguindo atenuar o quadro gerado pela intervenção combinada em 37%. Na Figura 5B, a análise de conteúdo de proteína GLUT4 em fração de membranas totais do músculo esquelético gastrocnêmio, mostra que somente o grupo FE apresentou aumento de 70% de GLUT4 ( $P < 0,01$ ) quando comparado ao grupo F e de aproximadamente 65% em relação ao grupo CE ( $P < 0,05$ ), o grupo A apresentou maior conteúdo proteico em relação aos grupos C, CE e AE ( $P < 0,05$ ), diferindo do conteúdo de mRNA, o grupo FAE apresentou uma melhora de 75% no conteúdo proteico comparado ao FA sendo o mesmo comportamento observado no conteúdo de mRNA

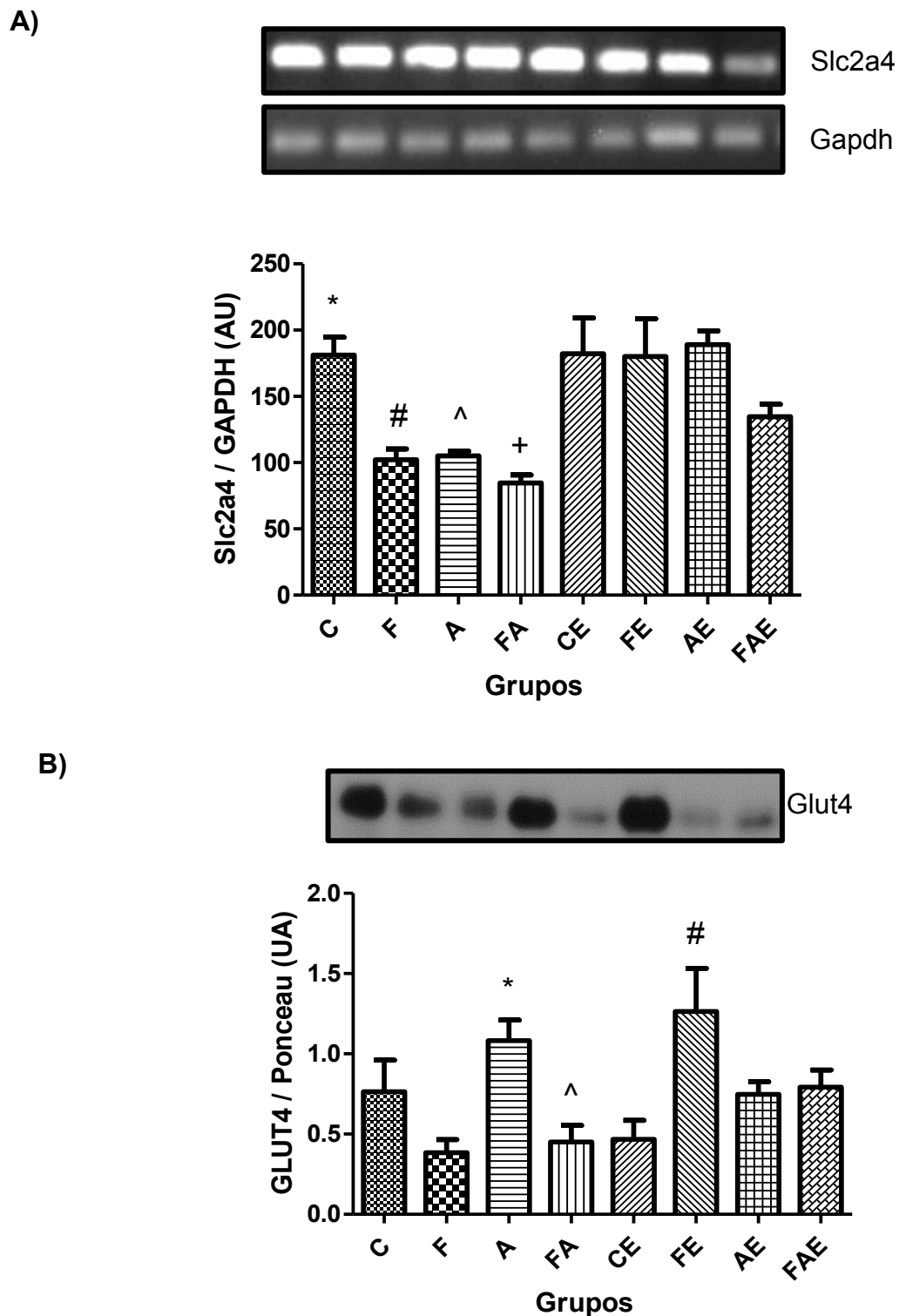


Figura 5 – Análise de expressão proteica da proteína transportadora de glicose GLUT4 no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos Wistar tabagistas e alcoolistas. Grupos: Controle(C), Fumante (F), Alcoolista (A), Fumante Alcoolista (FA), Controle Exercício (CE), Fumante Exercício (FE), Alcoolista Exercício (AE), Fumante Alcoolista Exercício (FAE). Em A) Análise da expressão gênica do SLC2A4. \*  $p < 0,05$  vs F, A, FA; #  $p < 0,05$  vs FE; ^  $p < 0,05$  vs AE; +  $p < 0,05$  vs FAE.

N=10. Em B) Conteúdo de proteína GLUT4 corrigido por Ponceau expressos em unidades arbitrárias. \*  $p < 0,05$  vs C, F; #  $p < 0,05$  vs F, CE; ^  $p < 0,05$  vs FAE. N=7.

## 5 Discussão

Na literatura atual o exercício físico está relacionado à prevenção e tratamento de doenças tais como Diabetes Mellitus, obesidade, doenças cardiovasculares, e síndrome plurimetabólica<sup>20,21</sup>. O tabagismo e a ingestão de álcool são hábitos que comprometem a qualidade de saúde do indivíduo e apresentam forte correlação com problemas cardiovasculares, pulmonares, metabólicos, contribuindo para desenvolvimento de síndrome plurimetabólica.

No consumo de álcool, cada grama de etanol fornece 7,1Kcal/g de energia, a qual é maior se comparada à energia obtida por ingestão de carboidratos (4kcal/g), proteínas (4kcal/g) e lipídios (9kcal/g), sendo o etanol fonte de energia desprovida de vitaminas e minerais. Possui ação em diversos órgãos e sistemas, resultando em alterações relacionadas à sua ação tóxica<sup>22</sup>, essa ação toxica não permite que o álcool seja estocado no organismo, sendo, portanto, eliminado diretamente<sup>23,24</sup>. O aproveitamento da energia fornecida pelo etanol depende do estado nutricional, da frequência e do modo de consumo que é utilizado, podendo levar ao sobrepeso e à obesidade, em consumidores moderados, e à desnutrição em usuários crônicos<sup>25,26</sup>. O etanol possui característica hidrossolúvel, sendo assim rapidamente absorvido pelos tecidos causando lesões sobre o epitélio intestinal, podendo interferir diretamente na absorção de nutrientes, minerais e vitaminas essenciais<sup>27</sup>. Todos estes fatores contribuem para a redução de massa corporal, perda de apetite, dieta de baixa qualidade e desnutrição específica<sup>22</sup>. Como pode ser visto na Tabela 1 e na Figura 1, como esperado, os ratos alcoolistas apresentaram menor consumo de ração menor índice de Lee e menor ganho de peso corpóreo frente aos animais controles. Por outro lado, ao praticar regularmente exercício físico, houve melhoria neste perfil, com resultados de consumo de ração, índice de Lee e peso corpóreo estabelecidos a valores próximos aos controles, sugerindo que o exercício físico bloqueou ou atenuou os efeitos negativos do álcool no organismo. FRANKLIN; McCULLOUGH<sup>28</sup> relataram em seus estudos que muitas das alterações provocadas pelo etanol como a diminuição do peso e diminuição do consumo alimentar, a atividade física conseguiu reverter, sendo um importante adjuvante no controle

metabólico, auxiliando ainda mais nas alterações provocadas pelo consumo de etanol<sup>29,30</sup>. Em relação ao consumo de álcool, o maior consumo apresentado pelos ratos exercitados pode ser justificado pelo fato destes animais receberem como única oferta de ingestão de líquidos a solução de álcool a 10% v/v. Assim, os animais, ao realizarem atividade física obviamente necessitam ingerir mais líquido em função de perda de água por suor durante a atividade e maior consumo celular.

A nicotina presente no cigarro vem sendo estudada e relacionada a várias alterações comportamentais como apetite, fome, ganho de peso, consumo alimentar<sup>31,32,33</sup>. Também vem sendo relacionada com alterações no metabolismo como o aumento da produção de calor e do consumo de oxigênio pelo organismo, aumento da taxa metabólica, estimulação de secreção de hormônio tireoideano, aumento da secreção gástrica, alteração de glicemia e colesterol no sangue, aumento da atividade adrenérgica, podendo levar a um aumento da termogênese, reduzindo o peso, e reduzindo a ingestão alimentar<sup>34,35,36</sup>. Estudos mostram que pacientes sob uso de reposição nicotínica, em processo de cessação do fumo, apresentam uma diminuição no aumento de peso, e, quando a medicação é suspensa, estes mesmos pacientes voltam a ganhar peso<sup>37,38</sup>. Um fato que pode explicar a redução de peso nas pessoas que utilizam a nicotina é que ela promove a elevação aguda da concentração cerebral de neurotransmissores tais como dopamina e serotonina, substâncias que são responsáveis pela inibição da ingestão de alimentos<sup>39</sup>, contribuindo para redução do apetite em fumantes e conseqüentes menores consumo de alimentos e peso corpóreo como podemos observar na Tabela 1 e Figura 1. Outra consideração é o fato do hormônio leptina estar aumentando em fumantes, sendo ele um hormônio peptídico liberado pelo tecido adiposo que sinaliza ao cérebro as informações de saciedade. A leptina se liga aos receptores do hipotálamo, aumentando a liberação de neuropeptídios de efeito anorexígeno e reduzindo a liberação de orexígenos<sup>40,41</sup>. Os animais submetidos à inalação de fumaça apresentaram índice de Lee (Tabela 1), que é um índice indicador de massa corpórea para animais, menor do que os ratos controles, bem como menor peso corpóreo (Figura 1), justificados pela menor ingestão alimentar (consumo de ração). Adicionalmente, comparando os resultados de animais fumantes e de animais alcoolistas, pode-se perceber grande semelhança entre eles, enfatizando o quanto fumar ou beber pode ter efeito sobre o perfil de peso e massa corpórea. Quando há combinação de etanol com nicotina esses valores foram mais

reduzidos, Na Figura 1 fica evidente o menor ganho de peso corpóreo no grupo que recebeu as duas intervenções (fumar e beber) em associação, justificado pela menor ingestão de ração e menor ingestão de álcool, o que somadas indica menor ingestão energética, corroborando com a ideia de que a combinação dos dois hábitos realmente contribui de forma significativamente prejudicial ao organismo. Quando ratos fumantes e alcoólicos realizaram exercício físico, este quadro é melhorado, com consumo de ração e álcool restabelecido, e ganho de peso corpóreo maior, porém ainda diferente do ganho de peso observado em animais não expostos à fumaça de cigarro.

A insulina é um hormônio anabólico tendo um papel importante na captação de glicose no músculo esquelético em repouso, a falta de insulina ou a ação prejudicada diminuem a captação de glicose, atingindo o músculo esquelético, que é o principal sítio responsável pela utilização de glicose mediada pela insulina<sup>42,43</sup>. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo crônico ou em elevada dose de álcool gera resistência à insulina, com prejuízo na utilização de glicose em avaliação por clamp euglicêmico hiperinsulinêmico em humanos e em ratos<sup>44,45</sup>. Por outro lado, consumo moderado de álcool pode auxiliar ou até melhorar a sensibilidade à insulina<sup>46,47</sup>. Em relação à nicotina tem sido demonstrado que fumantes apresentam menor sensibilidade à insulina em relação aos não-fumantes devido aos efeitos diretos da nicotina, monóxido de carbono ou outros agentes do tabaco<sup>48,49</sup>. Na figura 2 são apresentados resultados da constante de decaimento da insulina (kITT). Este teste se baseia no fato de que quanto maior o kITT, maior a inclinação da curva glicêmica, e, portanto, mais sensível o organismo é à insulina<sup>50</sup>. No presente estudo, a intervenção da exposição à fumaça de cigarro não modificou a sensibilidade à insulina, sugerindo que o tabagismo passivo não deve prejudicar diretamente a ação da insulina nos principais tecidos captadores de glicose. Por outro lado, a ingestão de álcool, independentemente da prática do exercício físico, causou redução na sensibilidade à insulina, prejudicando a manutenção da homeostasia glicídica e que a associação do álcool mais tabagismo (Figura 2) piorou ainda mais esta situação. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está claro na literatura, porém alguns trabalhos mostraram que o álcool parece não prejudicar a sinalização de insulina na musculatura e/ou no fígado<sup>44,46</sup>, porém pode prejudicar a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática<sup>51</sup>. Outra explicação pode ocorrer em função de

alteração da sensibilidade à insulina no fígado, o que aumentaria a produção de glicose hepática.

Na figura 3 são apresentados os resultados do teste de tolerância à glicose. Este teste serve para comprovar a atividade da insulina endógena secretada frente a uma sobrecarga glicídica. Como se observou no presente estudo, não houve diferenças significantes entre os grupos avaliados, sugerindo que realmente a secreção de insulina está adequada independentemente da exposição à fumaça de cigarro, ingestão de álcool ou a associação dos dois hábitos, bem como a realização de exercício físico regularmente. Wojtaszewski et al., 2000<sup>52</sup> revelou ação adicional das catecolaminas, na ativação da AMPK frente ao exercício físico. A ativação da AMPK ocorre como decréscimo do estado energético celular, quando a relação AMP:ATP aumenta, o que provoca alteração na molécula, ocorrendo fosforilação e ativação<sup>16</sup>. A AMPK fosforilada ativa vias que desempenham um papel fundamental na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, na regulação da sensibilidade à insulina e desativando as vias anabólicas que consomem ATP<sup>53</sup>. O aumento da fosforilação da AMPK promove a translocação de vesículas intracelulares contendo GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando o transporte de glicose para dentro da célula no músculo esquelético, de maneira independente e diferente da estimulação insulínica, sempre que houver atividade contrátil, por exemplo<sup>54</sup>. Na figura 4A a intervenção do fumo causou redução na expressão PrKaa2, o que não se refletiu no conteúdo de proteína AMPK (Fig. 4B). Por outro lado, a prática regular de exercício físico manteve a expressão do gene da AMPK similar aos grupos controles, o mesmo ocorrendo na expressão proteica. Padrão similar ocorreu com a ingestão de álcool e álcool + exercício, evidenciando que o exercício foi eficiente em promover melhoria em proteína relacionada ao metabolismo celular e aproveitamento energético. Considerando que esta proteína tem ativação frente ao estímulo de gasto energético durante a atividade contrátil do músculo, é interessante que durante o período pós-exercício ela trabalhe para que mais energia seja produzida na célula. Estes achados podem se relacionar com os dados encontrados na Figura 2 e 3, uma vez que embora a resistência à insulina esteja aumentada em ratos que sofreram a intervenção do álcool e fumo (Fig. 2), quando observamos a Figura 3, confirma-se que não há prejuízo na depuração de glicose entre os grupos, provavelmente em função do estímulo pela AMPK. Assim, sendo a expressão de AMPK maior nos mesmos grupos exercitados FE, AE, FAE mostrando que a captação que a captação

de glicose foi feita pela ação da AMPK, durante o exercício e momento pós-exercício<sup>55,56</sup>. Interessantemente não se observa correlação entre conteúdo de mRNA e de proteína AMPK, sugerindo regulação da proteína em nível pós-transcricional mediante às intervenções utilizadas no estudo. Estudos posteriores deverão ser realizados para investigação mais aprofundada sobre a regulação de AMPK por estes disruptores endócrinos sendo esses achados semelhantes ao observado para a proteína GLUT4 nos estudos<sup>57,58</sup>.

Em diversas circunstâncias fisiológicas, o transporte de glicose por meio da membrana plasmática é um fator importante na utilização de glicose pelo músculo esquelético<sup>59</sup>. A insulina e a atividade física são os principais estimulantes fisiológicos mais relevantes no transporte de glicose do músculo esquelético<sup>60</sup>. Tanto o fumo como o álcool regularam negativamente a expressão do gene *Slc2a4* no músculo esquelético (Figura 5A). Em estudos prévios, foi sugerido que um provável regulador negativo ativado pela exposição à fumaça de cigarro poderia ser o fator induzido por hipóxia (*Hif1a*), o qual, segundo a literatura tem efeito inibidor da transcrição de *Slc2a4*<sup>61</sup>. Neste estudo, não foi avaliada a expressão de *Hif1a*, porém, em estudos anteriores foi confirmada esta hipótese<sup>62</sup>. O álcool, inesperadamente reduziu a expressão de *Slc2a4*, porém aumentou o conteúdo de proteína GLUT4 comparado aos animais controles. Este resultado de aumento de conteúdo de GLUT4 corrobora com estudo na literatura em que se verificou aumento no conteúdo proteico de GLUT4 no miocárdio de ratos que ingeriram álcool durante 7 semanas numa dose elevada (50%/v)<sup>63</sup>, porém são controversos a outro estudo quando a ingestão de álcool em dose 50% / v foi crônica ao longo de 22 semanas<sup>64</sup>. Isso sugere que muito do efeito observado na expressão do GLUT4 pode ser dose-, tempo- e tecido-dependente.

A prática de exercício físico em ratos alcoolistas causou aumento de mRNA mas manteve conteúdo de proteína em nível semelhante aos animais controles. Por outro lado, o exercício físico melhorou a expressão do *Slc2a4*<sup>65,66</sup> mesmo quando expostos à fumaça de cigarro e/ou submetidos à ingestão de álcool, novamente salientando mais um benefício de se praticar atividade física mesmo com hábitos pouco convencionais de qualidade de vida. Novamente os resultados encontrados na análise da quantidade de mRNA no grupo alcoolista não refletem o conteúdo proteico no músculo gastrocnêmio (Figura 5A-B), sugerindo que, ao menos esta intervenção, deve estar regulando este gene em nível pós-transcricional<sup>57</sup>. Porém,

nos grupos FA Figura 5A e 5B, pode-se observar que, quando associadas, os dois tipos de intervenções, o etanol e o fumo parecem regular a proteína GLUT4 em nível transcricional, apresentando forte correlação de conteúdo de mRNA e de proteína. Corroborando com esta ideia, na literatura é comum encontrarmos diferenças no nível de regulação da proteína GLUT4, dependendo do modelo de resistência à insulina estudado<sup>57,58</sup>.

Pode-se concluir que o uso de álcool e / ou do tabaco, mesmo que passivamente, é prejudicial à ingestão calórica, à sensibilidade à insulina e expressão de proteínas AMPK e GLUT4, proteínas importantes do metabolismo muscular e homeostasia glicídica. Por outro lado, a prática regular de exercício físico moderado contribui importantemente para reverter, ou atenuar esta situação, aumentando/mantendo a quantidade da AMPK e de GLUT4, o que deve auxiliar na captação de glicose por via independente da ação da insulina, aumentando assim a possibilidade de manutenção da homeostasia glicídica, sugerindo que se trata de um elemento chave para o tratamento e/ou prevenção de alterações geradas mesmo na vigência de uso/consumo de álcool e tabaco.

## 6 Referências

- 1 World Health Organization [Internet]. Global information system on alcohol/tobacco and health. 2013
- 2 Sucov A, Woolard RH. Ethanol-associated hypoglycemia is uncommon. *Acad Emerg Med.* 1995;2(3):185-9.
- 3 Weis L, Schwanck GB, Silva JS, Lenzi LGS, Machado MB, Balotin R, Jotz GP, Haggström FM, Zettler EW. O papel da Proteína C Reativa (PCR) na detecção precoce de inflamação sistêmica em fumantes. *Rev AMRIGS.* 2007;51(2):128-31.
- 4 Zhang J, Liu Y, Shi J, Larson DF, Watson RR. Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002 Oct;227(9):823-9.
- 5 Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-κB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jul;291(1):46-57.
- 6 Marreiro DN, Geloneze DXB, Tambascia MA, Lerário AC, Halpern A, Cozzolino SMF. Participação do zinco na resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004 Apr;48(2):234-9.

7 Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):278-301.

8 Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body. *Alcohol Res Health.* 2006;29:245-54.

9 Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax.* 2004 Aug;59(8):713-21.

10 Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension.* 2005 May;45(5):828-33.

11 Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(2):171-6.

12 Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006 Apr;50(2):177-89.

13 Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2006 Oct;12(5):259-62.

14 Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:48-60.

15 Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002 Aug;46(4):419-25.

16 Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell. *Eur J Biochem.* 1997 Jun;246(2):259-73.

17 Miyamoto L, Toyoda T, Hayashi T, Yonemitsu S, Nakano M, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Inoue G, Fushiki T, Nakao K. Effect of acute activation of 5"-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2007 Mar;102(3):1007-13.

18 De Souza DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Da Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(6):443-7.

19 Silva PE, Alves T, Fonseca ATS, Oliveira MAN, Machado UF, Seraphim PM. O exercício físico melhora a sensibilidade à insulina de ratos expostos à fumaça de cigarro. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(3):202-6.

20 Ciolac EG, Guimarães GV. Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte.* 2004;10(4):319-24.

21 Rique ABR, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8(6):244-54.

22 Molina PE, Hoek JB, Nelson S, Guidot DM, Lang CH, Wands JR, Crawford JM. Mechanisms of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003 Mar;27(3):563-75.

23 Suter PM. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42(3):197-227.

24 Suter PM, Hasler E, Vetter W. Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity. *Nutr Rev*. 1997 May;55(5):157-71.

25 Aguiar AS, Da-Silva VA, Boaventura GT. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jun;37(6):841-6.

26 Aguiar AS, Silva VA, Boaventura GT. As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo. *Nutr Pauta*. 2007;15:45-9.

27 Fernandes EV, Goessler KF, Ramos SP, Altimari LR, Venancio EJ, Andrade FG. Efeitos da ingestão alcoólica crônica e do exercício físico na massa corporal, no consumo alimentar e na ingestão líquida de ratos wistar. *Rev Educ Fis UEM*. 2010;21(3):527-33.

28 Franklin BA, McCullough PA. Cardiorespiratory fitness: an independent and additive marker of risk stratification and health outcomes. *Mayo Clin Proc*. 2009 Sep;84(9):776-9.

29 Matsudo VKR, Matsudo SMM. Atividade física no tratamento da obesidade. *Einstein (Sao Paulo)*. 2006;4(Suppl 1):S29-S43.

30 Teixeira A, Muller L, Dos Santos AA, Reckziegel P, Emanuelli T, Rocha JB, Burger ME. Beneficial effects of gradual intense exercise in tissues of rats fed with a diet deficient in vitamins and minerals: a pilot study. *Nutrition*. 2009 May;25(5):590-6.

31 Mello PRB, Pinto GR, Botelho C. Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77(4):257-64.

32 Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81(3):221-4.

33 Gonçalves-Silva RMV, Lemos-Santos MG, Botelho C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J Pneumol*. 1997;23(3):124-30.

34 Larson PS, Haag HB, Silvette H. Some effects of nicotine and smoking on metabolic functions. *Clin Pharmacol Ther*. 1961;2:80-109.

35 Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev.* 2004;5(2):95-103.

36 Lee H, Joe KH, Kim W, Park J, Lee DH, Sung KW, Kim DJ. Increased leptin and decreased ghrelin level after smoking cessation. *Neurosci Lett.* 2006 Nov 27;409(1):47-51.

37 Pisinger C, Jorgensen T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter study. *Prev Med.* 2007 Apr;44(4):290-5.

38 Dale LC, Schroeder DR, Wolter TD, Croghan IT, Hurt RD, Offord, KP. Weight change after smoking cessation using variable doses of transdermal nicotine replacement. *J Gen Intern Med.* 1998 Jan;13(1):9-15.

39 Klein LC, Corwin EJ, Ceballos RM. Leptin, hunger, and body weight: Influence of gender, tobacco smoking, and smoking abstinence. *Addict Behav.* 2004 Jul;29(5):921-7.

40 Nicklas BJ, Tomoyasu N, Muir J, Goldberg AP. Effects of cigarette smoking and its cessation on body weight and plasma leptin levels. *Metabolism.* 1999 Jun;48(6):804-8.

41 Perkins KA, Fonte C. Effects of smoking status and smoking cessation on leptin levels. *Nicotine Tob Res.* 2002 Nov;4(4):459-66.

42 Weinstein S, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism.* 1998 Jan;47(1):3-6.

43 Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond).* 2005 Feb 2;2(3). doi: [10.1186/1743-7075-2-3](https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-3); PubMed Central PMCID: PMC548667.

44 Onishi Y, Honda M, Ogihara T, Sakoda H, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Shojima N, Fukushima Y, Inukai K, Katagiri H, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Ethanol feeding induces insulin resistance with enhanced PI3-K activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Apr 11;303(3):788-94.

45 Wang Q, Liu Y, Guan Q, Gao L, Lee KO, Zhao J. Ethanol feeding impairs insulin-stimulated glucose uptake in isolated rat skeletal muscle: role of Gs and cAMP. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Aug;29(8):1450-6.

46 Bell RA, Mayer-Davis EJ, Martin MA, D'Agostino RB, Haffner SM. Associations between alcohol consumption and insulin sensitivity and cardiovascular disease risk factors: the Insulin Resistance and Atherosclerosis Study. *Diabetes Care.* 2000 Nov;23(11):1630-6.

47 Zilkens RR, Burke V, Watts G, Beilin LJ, Puddey IB. The effect of alcohol intake on insulin sensitivity in men: a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2003 Mar;26(3):608-12.

48 Eliasson B, Attvall S, Taskinen MR, Smith U. The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits *Arterioscler Thromb*. 1994 Dec;14(12):1946-50.

49 Henkin L, Zaccaro D, Haffner S, Karter A, Rewers M, Sholinsky P, Wagenknecht L. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and insulin sensitivity: the insulin resistance Atherosclerosis Study. *Ann Epidemiol*. 1999 Jul;9(5):290-6.

50 Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006 Apr;50(2):208-15.

51 Poirier LA, Rachdaoui N, Nagy LE. Glut4 vesicle trafficking in rat adipocytes after ethanol feeding: regulation by heterotrimeric G-proteins. *Biochem J*. 2001 Mar 1;354(Pt 2):323-30.

52 Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2000 Oct;528(Pt 1):221-6.

53 Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Souza CT. Efeitos do exercício físico na expressão e atividade da AMPK $\alpha$  em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(2):98-103.

54 McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron-Smith D, Kemp BE, Hargreaves M. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):926-8.

55 Torres-Leal FL, Capitani MD, Tirapegui J. The effect of physical exercise and caloric restriction on the components of metabolic syndrome. *Braz J Pharm Sci*. 2009;45(3):379-99.

56 Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009 Jun;53(4):399-408.

57 Seraphim PM, Nunes MT, Gianocco G, Machado UF. Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Sep 30;276(1-2):80-7.

58 Alves-Wagner AB, De Freitas HS, De Souza PB, Seraphim PM, Mori RC, Machado UF. Beta-adrenergic activity preserves GLUT4 protein in glycolytic fibers in fasting. *Muscle Nerve*. 2009 Nov;40(5):847-54.

59 Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. Impaired glucose transport as a

cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 1999 Jul 22;341(4):240-6.

60 Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise glucose transport and insulin sensitivity. *Ann Rev Med.* 1998;49:235-61.

61 Silva JL, Giannocco G, Furuya DT, Lima GA, Moraes PA, Nacheff S, Bordin S, Britto LR, Nunes MT, Machado UF. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1- $\alpha$  involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Aug 30;240(1-2):82-93.

62 Gomes PRL. Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a expressão de GLUT4 em ratas prenhes e lactantes e sua prole [dissertação]. Presidente Prudente: Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista; 2010.

63 Elmadhun NY, Lassaletta AD, Burgess T, Sabe AA, Sellke FW. Alcohol consumption improves insulin signaling in the myocardium. *Surgery.* 2013 Aug;154(2):320-7.

64 Chen LY, Wang F, Sun XL, Zhou J, Gao L, Jiao YL, Hou X, Qin CY, Zhao J. Chronic ethanol feeding impairs AMPK and MEF2 expression and is associated with GLUT4 decrease in rat myocardium. *Exp Mol Med.* 2010 Mar 31;42(3):205-15.

65 Houmard JA, Shinebarger MH, Dolan PL, Leggett-Frazier N, Bruner RK, McCammon MR, Israel RG, Dohm GL. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. *Am J Physiol.* 1993 Jun;264(6 Pt 1):896-901.

66 Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated. *Physiology (Bethesda).* 2005 Aug;20:260-70.