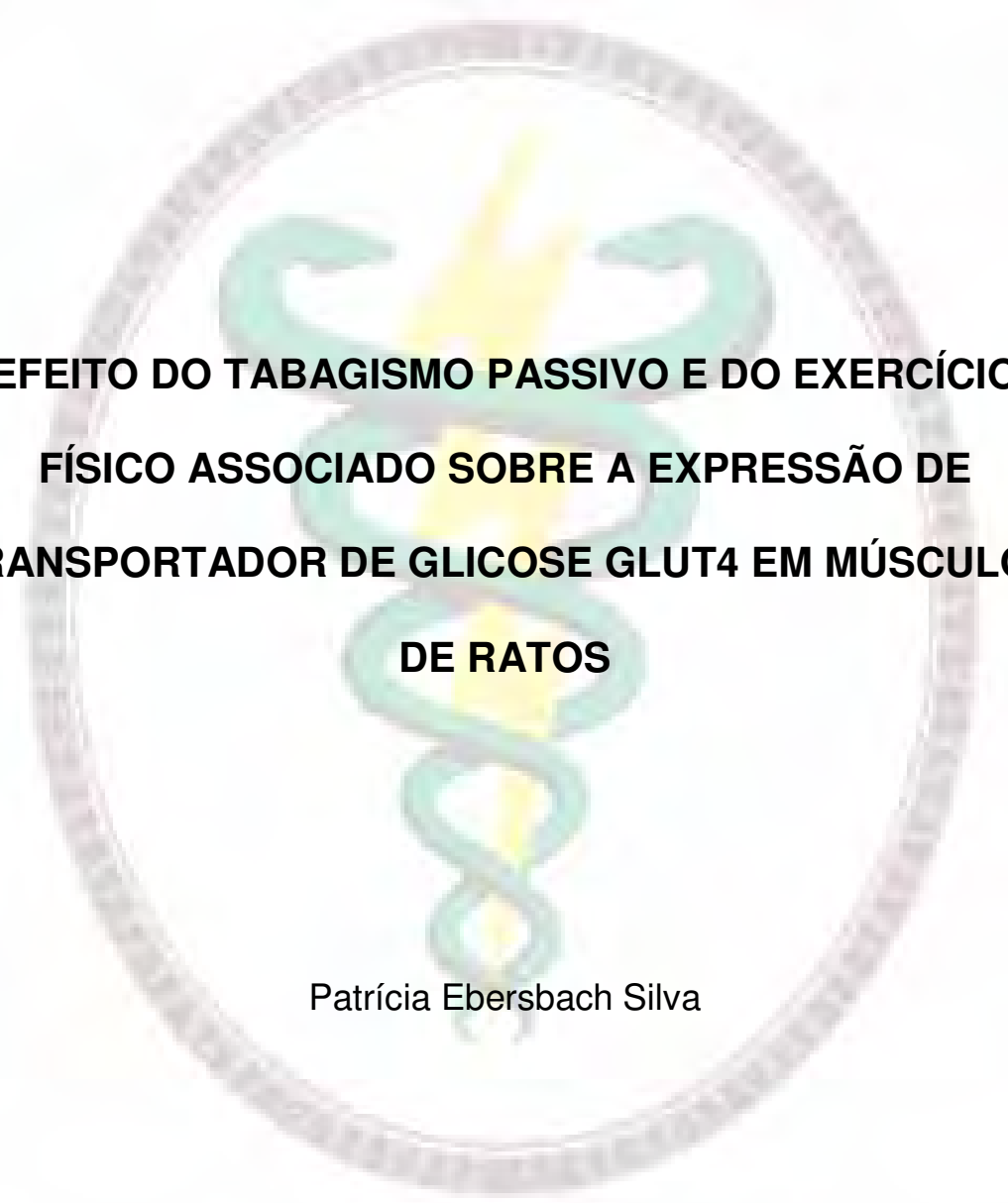




**Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia**




**EFEITO DO TABAGISMO PASSIVO E DO EXERCÍCIO  
FÍSICO ASSOCIADO SOBRE A EXPRESSÃO DE  
TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT4 EM MÚSCULOS  
DE RATOS**

Patrícia Ebersbach Silva

Presidente Prudente  
2009

**PATRÍCIA EBERSBACH SILVA**

**EFEITO DO TABAGISMO PASSIVO E DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO  
SOBRE A EXPRESSÃO DE TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT4 EM  
MÚSCULOS DE RATOS**



Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente  
2009

S58e Silva, Patrícia Ebersbach.  
Efeito do tabagismo passivo e do exercício físico associado sobre a expressão de transportador de glicose GLUT4 em músculos de ratos / Patrícia Ebersbach Silva. - Presidente Prudente : [s.n], 2009  
xxix, 92 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Orientadora: Patrícia Monteiro Seraphim  
Banca: Ubiratan Fabres Machado, Ercy Mara Cipulo Ramos  
Inclui bibliografia

1. GLUT4. 2. Tabagismo. 3. Exercício Físico. I. Autor. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

CDD(18.ed.) 796



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



### BANCA EXAMINADORA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. PATRÍCIA MONTEIRO SERAPHIM  
(ORIENTADORA)

PROF. DR. UBIRATAN FABRES MACHADO  
(USP/SP)

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ERCY MARA CIPULO RAMOS  
(FCT/UNESP)

  
PATRÍCIA EBERSBACH SILVA

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 10 DE DEZEMBRO DE 2009.

RESULTADO: APROVADA



Dedico este trabalho aos meus pais **Benedito e Valdina**, e a minha irmã **Carla** pelo constante esforço para minha formação e pelo amor incondicional que me deram, o qual foi fundamental para a superação de minhas dificuldades. Saibam que apesar da distância, vocês sempre estiveram em meus pensamentos, nos momentos de alegrias e de tristezas. Esta dedicatória significa muito pouco, perto de todo esforço, amor e carinho que desprenderam por mim ao longo de todos estes anos.



O presente trabalho, pelos fins acadêmicos, é considerado um trabalho individual, mas não posso deixar de ressaltar que outras pessoas colaboraram, direta ou indiretamente, para que seus objetivos fossem alcançados. A colaboração que tive não se restringe apenas à relação científica e prática, mas também a um sorriso, uma conversa, um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, etc. Todos os agradecimentos listados abaixo são profundos e especiais, desculpe se esqueci de alguém...

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida, pela graça de me titular “Mestre em Fisioterapia”, por ter me dado forças para enfrentar as dificuldades encontradas, por ter me guiado e me protegido ao longo desses dois anos de curso. “Tudo posso naquele que me fortalece”

Agradeço, especialmente, a minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim, a quem respeito e admiro muito, e que não foi somente uma orientadora, mas também uma grande amiga. Agradeço, principalmente por acreditar em minha capacidade e nos frutos deste trabalho de dissertação. Sou imensamente grata pelo incentivo, por sempre me indicar o rumo a ser tomado nos momentos de grande dificuldade (intercorrências cotidianas), por compartilhar seu conhecimento científico, pelo carinho, dedicação e paciência que teve comigo ao longo do curso. Estes dois anos foram muito valiosos para a minha formação científico-pessoal e isto jamais será perdido graças a sua efetiva participação.

Meus pais, Benedito e Valdina, e minha irmã, Carla, pelo amor, carinho, compreensão e pelo constante incentivo, mesmo à distância.

Ao meu marido, Clayton S. Sena, por todo o seu amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

A todos os professores, titulares e convidados, do programa de Mestrado em Fisioterapia da FCT- UNESP, que não mediram esforços para a construção deste



curso e que participaram, positivamente, na minha formação científica durante estes dois anos de curso.

Aos professores da banca, Dra. Ercy Mara Cipulo Ramos e Dr. Ubiratan Fabres Machado, pela disponibilidade em contribuir para os acertos finais deste trabalho.

A todos os amigos que integram o Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis) pela convivência, amizade, compreensão, colaboração e respeito neste período que passamos juntos.

As minhas colegas de trabalho, Thâmara Alves e Ághata Tomoko S. Fonseca, que sentiram na pele como é difícil conviver comigo. Agradeço pelo companheirismo e profissionalismo que demonstraram.

Ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho, pela disponibilização do biotério e de materiais utilizados no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pelas cooperações, permitindo a execução de algumas práticas experimentais em seu laboratório.

Agradeço também a todos que, involuntariamente foram omitidos, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro que tornou concreta a possibilidade de realização desta pesquisa. Processos n° 2004/10130-0 e 2008/01955-6.



*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

*Madre Teresa de Calcutá*



**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1.
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17.
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19.
3.1. Animais de Experimentação .....	19.
3.2. Caracterização do Sistema de Inalação .....	19.
3.3. Caracterização da Esteira Rolante .....	21.
3.4. Grupos de experimentação .....	22.
3.5. Protocolos de Experimentação .....	22.
3.6. Teste de tolerância à insulina (ITT) .....	23.
3.7. Obtenção de amostras de sangue e tecidos .....	24.
3.8. Quantificação de Proteínas do Transportador de Glicose GLUT4 ...	25.
3.8.1. Preparação das amostras para o Western Blotting .....	25.
3.8.2. Método Lowry para dosagem de proteínas .....	26.
3.8.3. Western Blotting - Quantificação de proteína GLUT4 .....	26.
3.9. Quantificação do mRNA do transportador de glicose GLUT4 .....	29.
3.9.1. Extração de RNA total .....	29.
3.9.2. RT-PCR: Semi-Quantificação do mRNA do GLUT4 .....	30.
3.10. Análise dos Dados .....	32.
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34.

4.1. Análise do peso .....	34.
4.2. Análise da glicemia .....	35.
4.3. Análise da sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (kITT).....	36.
4.4. Análise da expressão de transportador de glicose GLUT4.....	38.
4.4.1. Músculo oxidativo sóleo .....	38.
4.4.2. Músculo glicolítico EDL .....	45.
4.4.3. Músculo cardíaco .....	52.
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56.</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72.</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75.</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>90.</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>92.</b>



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 01</b> – Via de sinalização da insulina .....	4.
<b>Figura 02</b> – Modelo proposto da estrutura da proteína transportadora de glicose ...	5.
<b>Figura 03</b> – Mecanismo proposto através do qual o exercício aumenta a captação de glicose no músculo .....	12.
<b>Figura 04</b> – Desenho esquemático da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça .....	20.
<b>Figura 05</b> – Vista externa da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça .....	20.
<b>Figura 06</b> – Esteira rolante para animais de pequeno porte, vista externa e interna .....	21.
<b>Figura 07</b> – Curva de crescimento médio dos animais ao longo de 9 semanas.....	34.
<b>Figura 08</b> – Glicemia de jejum dos animais no dia do sacrifício .....	36.
<b>Figura 09</b> – Teste de tolerância à insulina in vivo (ITT).....	37.
<b>Figura 10</b> – Análise da expressão de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo .....	38.
<b>Figura 11</b> – Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo, correspondente à fração de membrana plasmática (MP). .....	40.
<b>Figura 12</b> – Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo, correspondente à fração de membrana microssomal (M).....	42.



<b>Figura 13</b> – Somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática (MP) e de microsossoma (M) de baixa densidade do tecido solear. ....	43.
<b>Figura 14</b> – Índice de translocação da proteína transportadora GLUT4 para a membrana plasmática no músculo sóleo .....	44.
<b>Figura 15</b> – Análise da expressão de RNAm do GLUT4 no músculo EDL. ....	45.
<b>Figura 16</b> – Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo EDL, correspondente à fração de membrana plasmática (MP) .....	47.
<b>Figura 17</b> – Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo EDL, correspondente à fração de membrana microsossomal (M).....	49.
<b>Figura 18</b> – Somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática (MP) e de microsossoma (M) de baixa densidade do músculo EDL .....	50.
<b>Figura 19</b> – Índice de translocação da proteína transportadora GLUT4 para a membrana plasmática no músculo EDL.....	51.
<b>Figura 20</b> – Análise da expressão de RNAm do GLUT4 no tecido cardíaco .....	52.
<b>Figura 21</b> – Conteúdo protéico de GLUT4 no tecido cardíaco, correspondente à fração de membranas celulares totais (MT) .....	54.



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 01</b> – Peso corporal e peso dos tecidos extraídos dos animais durante o sacrifício .....	35.
<b>Tabela 02</b> – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana plasmática (MP) sob diferentes análises .....	39.
<b>Tabela 03</b> – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana microsomal de baixa densidade (M) sob diferentes análises .....	41.
<b>Tabela 04</b> – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo EDL na fração de membrana plasmática (MP) sob diferentes análises.....	46.
<b>Tabela 05</b> – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo EDL na fração de membrana microsomal de baixa densidade (M) sob diferentes análises .....	48.
<b>Tabela 06</b> – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo cardíaco na fração de membrana total (MT) sob diferentes análises .....	53.



**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

**AGL** – Ácidos graxos livres

**AMP** – Adenosina monofosfato

**APS** – Persulfato de amônio

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BSA** – Albumina bovina sérica

**cDNA** – Ácido desoxirribonucléico complementar

**DEPC** – Dietilpirocarbonato

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**DTT** – Ditioneitol

**EDL** – Extensor longo dos dígitos

**EDTA** –Etilenodiaminotetraacetato dissódico

**EPM** – Erro padrão médio

**EtBr** - Brometo de Etídio

**IR** – Receptor de insulina

**IRS** – Substrato do receptor de insulina

**ITT** – Teste de tolerância à insulina

**M** – Membrana microssomal

**MP** – Membrana plasmática

**MT** – Membrana total

**PBS** – Tampão fosfato salina

**RNA** - Ácido ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro

**RT-PCR** – Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase

**SDS** – Sódio dodecil sulfato

**SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida

**TAE** – Tampão Tris-Acetato-EDTA

**TEMED** – N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina

**TRIS** – Trizma base – tris(hidroximetil)aminometano



## RESUMO

O tabagismo altera o metabolismo celular em vários aspectos e evidências apontam que este pode desencadear um quadro de resistência à insulina e, em longo prazo, Diabetes tipo 2. Dentre as alterações metabólicas mais importantes associadas à resistência à insulina, encontra-se a alteração na quantidade de transportador de glicose GLUT4 disponível na membrana plasmática de tecido muscular e tecido adiposo. No entanto, a atividade física aparece como um dos fatores que poderia modificar o risco dos indivíduos desenvolverem resistência insulínica e/ou diabetes, uma vez que pode aumentar a expressão da proteína e do RNAm do transportador de glicose GLUT4, estimulando o transporte de glicose por uma via independente da via de sinalização da insulina. Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tabagismo e de atividade física moderada associada sobre a sensibilidade à insulina em músculos de ratos, através da quantificação de proteína e do RNAm do transportador de glicose GLUT4. Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar, divididos em 4 grupos: (CS) grupo controle, (CE) controle exercitado, (FS) fumante sedentário e (FE) fumante submetido a exercício físico. Os grupos FS e FE foram submetidos à combustão de 4 cigarros/vez, 30 minutos, 2x/dia, durante 60 dias. Os grupos CE e FE executaram protocolo de exercício em esteira rolante, 60 dias, 60 minutos por sessão. Foi realizado Teste de Tolerância à Insulina (ITT), dose de insulina regular 0,5 U/Kg PC, e tempos de coleta 0 (antes) e 5, 10, 15, 20 min. (pós-injeção). Durante o sacrifício dos animais a glicemia caudal foi mensurada por glicosímetro e os tecidos sóleo, extensor longo dos dígitos (EDL) e coração foram removidos, sob anestesia, para posterior análise. A quantificação da proteína GLUT4 das amostras foi feita utilizando-se a técnica de Western Blotting – ECL e a expressão de RNAm do GLUT4 foi analisada pela técnica de RT-PCR. Os resultados mostraram que nem o tabagismo, nem a atividade física alteram o peso corpóreo e o peso dos tecidos nos grupos estudados. A glicemia também não foi alterada entre os grupos, porém a sensibilidade à insulina encontrava-se bem reduzida no grupo fumante não exercitado. Pelas análises de conteúdo de RNAm



do GLUT4 no músculo sóleo verificou-se aumento significativo nos grupos FS e CE quando comparados ao CS. Nas análises do conteúdo protéico de GLUT4 no tecido solear, observou-se redução de transportador na membrana plasmática (MP) no grupo FS comparado ao CS, e aumento significativo no grupo FE comparado ao FS. Já na membrana microssomal (M), verificou-se uma forte tendência à elevação do conteúdo de transportador nos animais exercitados e um aumento discreto no conteúdo de GLUT4 no fumante comparado ao controle, evidenciando discrepâncias entre conteúdos de RNAm e de proteína no músculo oxidativo. No músculo EDL, não houve alteração no conteúdo de RNAm do GLUT4 entre os grupos. Já os resultados do conteúdo protéico neste músculo mostraram uma diminuição significativa de GLUT4 na MP devido ao tabagismo, o que não foi revertido com a prática de exercício físico. Na membrana microssomal não houve diferenças entre os grupos. Pela análise do conteúdo de RNAm do GLUT4 nas amostras de músculo cardíaco não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados e os resultados de proteína evidenciaram uma redução no conteúdo de GLUT4 devido ao tabagismo. Este quadro foi completamente revertido com a prática de exercício físico. Assim, conclui-se que fumar, além de todas as alterações já descritas em literatura envolvendo doenças respiratórias, cardiovasculares e vários tipos de câncer pode também ser prejudicial à homeostasia glicídica, e que a prática de exercício físico moderado recorrente pode ser um método importante para combater os efeitos deletérios causados pelo fumo, melhorando, sobretudo a captação de glicose em músculos oxidativos.

**Palavras chaves:** Tabagismo, Resistência Insulínica, Transportador de Glicose, GLUT4 Exercício, Ratos Wistar.



**ABSTRACT**

Cigarette smoking changes the cellular metabolism in many aspects and evidences suggest that it is related to insulin resistance and type 2 diabetes. Within the metabolic alterations associated to insulin resistance we can mention disturbs on GLUT4 content in plasma membrane of muscle e adipose tissue. However, physical activity appears as a factor that could modify the risk for these pathologies, increasing GLUT4 expression and stimulating glucose transport, in an independent-pathway of insulin signaling. In this context, this study aimed to evaluate the effect of smoking and moderated physical activity on insulin sensitivity in muscle of rats, by quantifying GLUT4 protein and mRNA. For this study, it was used Wistar rats divided into 4 groups: control (CS), control submitted to an exercise protocol (CE), sedentary smoker (FS) and smoker submitted to an exercise protocol (FE). The FS and FE groups were submitted to cigarette smoke exposition, 4 cigarettes/30 min./twice a day for 60 days. Groups CE and FE performed running on a treadmill for 60 days during 60 minutes per session. It was performed an insulin tolerance test (ITT), insulin dose of 0.5 U / kg body weight, and collection time 0, 5, 10, 15, 20 min. During the animals's sacrifice, blood glucose was measured by glucometer and the muscles soleus, extensor digitorum longus (EDL) and heart were removed, under anesthesia, for further analysis. Quantification of GLUT4 protein was done using the Western Blotting - ECL technique and the expression of GLUT4 mRNA was analyzed by RT-PCR. The results showed that neither smoking nor physical activity changed the body weight and the tissues weight of the groups. Blood glucose was unchanged between the groups, but insulin sensitivity was lower in the smoking group. The mRNA analysis of GLUT4 in the soleus muscle showed a significant increase in CE and FS compared to CS. When analyzed the protein content of GLUT4 in soleus, there was a reduction of transporter in the plasma membrane (PM) in the FS compared to CS and a significant increase in group FE compared to FS. In the microsomal membrane (M), there was a tendency to an increase in the GLUT4 content of the active animals and a slight increase in the amount of GLUT4 of smokers compared

to control. Showing divergence between GLUT4 mRNA and protein contents at the oxidative muscle. The analysis of GLUT4 mRNA in EDL muscle showed no statistical difference between the groups. The results of protein content in the same muscle, demonstrated that there was a significant decrease in the GLUT4 amount in the PM fraction caused by cigarette smoking, which was not reversed by physical exercise. In microsomal membrane, there were no differences between groups. Considering the GLUT4 mRNA content analysis in heart, there was no statistical difference between groups. The results of protein showed a reduction in the amount of GLUT4 due to smoking and this condition was completely reversed by physical exercise. Thus, we concluded that smoking, besides all the changes already described in literature involving respiratory diseases, cardiovascular problems and many types of cancer can also be harmful to glucose homeostasis, and that the practice of moderate physical exercise may be an important method to combat the deleterious effects caused by smoking, improving glucose uptake in oxidative muscles.

**Key-words:** Cigarette Smoking, Insulin Resistance, Glucose Transporter, GLUT4, Exercise, Wistar Rats.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Tabagismo

No mundo atual, o tabaco é uma droga lícita largamente utilizada e disseminada. Os cigarros tornaram-se populares no século XX, havendo maior disponibilidade do tabaco e aperfeiçoamento dos instrumentos de produção em massa. Fatores como o controle da dosagem (profundidade da tragada), disponibilidade, poder aquisitivo e aceitação social influenciaram a disseminação do uso de cigarros <sup>(1)</sup>.

Estima-se que 1/3 da população mundial adulta (1 bilhão e 200 milhões de pessoas) seja fumante <sup>(2, 3)</sup> e o tabagismo é considerado um relevante problema de saúde pública em todo o mundo, devido às más conseqüências que traz à saúde e à qualidade de vida da população.

O hábito de fumar tem sido declarado importante fator de risco para a causa de inúmeras doenças, tais como, câncer (pulmão, laringe, esôfago, boca, bexiga, pâncreas, rim, estômago e colo uterino), doenças ateroscleróticas (doença coronária, doença vascular periférica, derrame cerebral), doença pulmonar obstrutiva crônica e úlcera péptica <sup>(3,4,5)</sup>.

Os altos prejuízos impostos pelo consumo do tabaco são uma pesada carga não só para a saúde individual, mas também para a saúde financeira da sociedade<sup>(6)</sup>. A mortalidade mundial por doenças tabaco-relacionadas está em torno de 4,9 milhões de mortes por ano. Estima-se que de 2025 a 2030, nos países em desenvolvimento, sete milhões de pessoas morrerão devido ao uso de tabaco, destacando que o fumo mata mais que AIDS, drogas legais e ilegais, acidentes automobilísticos, assassinatos e suicídios, todos juntos <sup>(7)</sup>.

Existem basicamente dois tipos de tabagismo: ativo (fumaça inalada pelo fumante durante o ato de fumar) e passivo (fumaça inalada por indivíduos não-fumantes em ambientes fechados) <sup>(8)</sup>. O tabagismo passivo é hoje o principal e mais disseminado poluente presente no meio interior. Calcula-se que seja a

terceira causa evitável de morte em alguns países desenvolvidos, depois do tabagismo ativo e do alcoolismo <sup>(9)</sup>.

São considerados dois fluxos de fumaça que saem do cigarro: a fumaça central e a fumaça periférica<sup>(10)</sup>. A fumaça central é formada quando o fumante traga o cigarro, é produzida com altas temperaturas, acima de 950°C, e polui o ambiente após ter sido puxada através do cigarro, filtrada pelos pulmões do fumante e em seguida exalada. A fumaça periférica é produzida em temperaturas mais baixas, 350°C, durante a queima lenta do cigarro, entre as tragadas. Cerca de 85% da fumaça do cigarro no ambiente resulta deste tipo de fumaça que não passa pelo filtro, e é liberada diretamente no ambiente a partir da queima espontânea da extremidade do cigarro <sup>(11)</sup>.

A fumaça que sai da ponta do cigarro (periférica) possui uma quantidade de substâncias tóxicas muito maior do que a fumaça que é inalada pelo fumante (central), contendo 3 vezes mais nicotina, 3 vezes mais monóxido de carbono, 50 vezes mais substâncias cancerígenas<sup>(6)</sup>. É uma mistura de cerca de 4.700 substâncias tóxicas, algumas das quais apresentam ação farmacológica ativa, citotóxica, antigênica, mutagênica e carcinogênica <sup>(12)</sup>. Essa fumaça apresenta uma fase gasosa (92%) e outra particulada (8%). A fase gasosa é composta, entre outros, por monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, amônia, nitrosamidas voláteis, cianeto, compostos voláteis contendo enxofre, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, amônio, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada contém água, nicotina e alcatrão, que concentra 43 substâncias cancerígenas, dentre as quais estão o arsênico, níquel, benzopireno, cádmio e chumbo <sup>(1, 10, 13)</sup>.

Dentre os componentes do cigarro temos a nicotina, um alcalóide vegetal com propriedades psicoativas, que exerce ação estimulante e depressora ganglionar dose-dependente e que contém elevada capacidade para induzir dependência física e psicológica<sup>(14)</sup>.

A nicotina se liga a receptores colinérgicos nos gânglios autônomos, na medula adrenal, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central<sup>(15)</sup>. Os efeitos simpaticomiméticos da nicotina são mediados por vários mecanismos,

podendo ocorrer pela ativação de quimiorreceptores periféricos e efeitos diretos no tronco cerebral, resultando em aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição coronária e aumento da pressão arterial e também causa secreção de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal<sup>(1)</sup>. O mecanismo de dependência da nicotina inclui a ativação da via da recompensa, o sistema dopaminérgico meso-corticolímbico. A ativação da via dopaminérgica é responsável pelo efeito reforçador positivo, que inclui relaxamento, redução do estresse, aumento do estado de vigília, melhora da função cognitiva, modulação do humor e perda de peso. O efeito reforçador negativo refere-se aos sintomas de retirada da nicotina, que inclui nervosismo, irritabilidade, ansiedade, concentração e função cognitiva prejudicadas, além do ganho de peso devido ao aumento do apetite<sup>(1)</sup>.

## **1.2. Relação entre insulina e transportador de glicose.**

Para suprir os requerimentos energéticos de uma célula, a glicose deve fluir para dentro da mesma, porém sendo a glicose uma molécula polar esta não é capaz de atravessar sozinha a membrana celular. Assim, a glicose é transportada, na maioria das células, por difusão facilitada, o que envolve a participação de uma proteína transportadora. Em alguns tecidos, este processo é estimulado pela insulina, um hormônio anabólico que estimula a síntese de glicogênio tanto no tecido hepático quanto no tecido muscular, estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos, além de reduzir a lipólise<sup>(16)</sup>.

A via de sinalização da insulina envolve sua ligação com receptor, o que promove a autofosforilação dos resíduos de tirosina de suas subunidades  $\beta$  (Fig. 01). Este processo desencadeia subseqüentes fosforilações de vários substratos protéicos como os membros da família dos substratos do receptor de insulina (IRS) -1, -2, -3 e -4, Shc, Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, JAK2 e APS. Os domínios de fosfotirosina nestes substratos se ligam ao domínio SH2 em proteínas tais como fosfatidilinositol 3 – cinase (PI(3)K). Uma vez ativada a PI(3)K pode ocorrer a fosforilação da PKB/Akt, em resíduos de serina/treonina. A PKB/Akt por sua vez



estimulará a translocação de transportador de glicose para a membrana plasmática<sup>(16,17)</sup>.

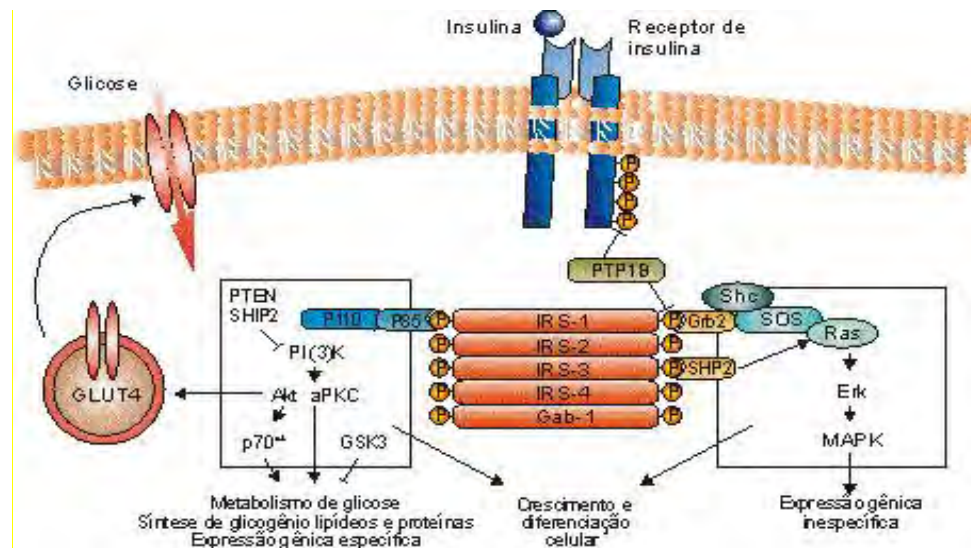


Fig. 01 - Via de Sinalização da insulina culminando na estimulação de translocação do transportador de glicose GLUT4<sup>(17)</sup>.

Como já mencionado anteriormente, a captação de glicose estimulada pela insulina acontece por mediação de transportadores de membrana (SLC2A gene símbolo e GLUT proteína símbolo) que tem por função permitir a entrada da glicose para o meio intracelular por difusão facilitada de acordo com um gradiente de concentração. Atualmente, 13 isoformas de transportadores de glicose são conhecidas, denominadas GLUTs 1 a 12 e o transportador H<sup>+</sup> ligado ao mioinositol (HMIT)<sup>(154)</sup>.

Os transportadores de glicose são expressos de forma tecido e célula-específicos, apresentando propriedades cinéticas e reguladoras distintas que refletem seus papéis definidos no metabolismo celular da glicose e homeostase glicêmica corporal total<sup>(18)</sup>.

Em 1985, MUECKLER e colaboradores<sup>(19)</sup> propuseram um modelo de orientação bidimensional para as proteínas transportadoras de glicose na membrana celular, e análises posteriores indicam que as isoformas possuem uma organização topográfica, tamanho (aproximadamente 500 aminoácidos) e orientação na membrana plasmática semelhantes. A Figura 02 mostra a estrutura molecular básica dessas proteínas de membrana. As proteínas transportadoras de glicose possuem 12 segmentos transmembrânicos e as alças curtas de conexão dos segmentos são áreas que se conservam iguais nas diferentes isoformas. Assim essas regiões devem servir a uma função comum a todas as isoformas, e provavelmente aminoácidos das seqüências transmembrânicas constituam um canal ou poro através dos quais a glicose flui.

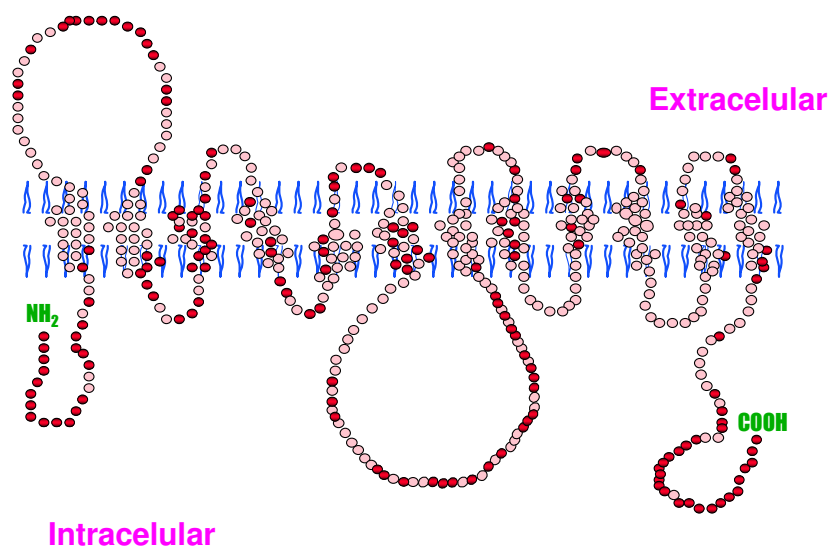


Fig. 02 – Modelo proposto da estrutura da proteína transportadora de glicose<sup>(19)</sup>. A figura mostra a homologia entre as isoformas GLUT1 e GLUT4. As bolinhas róseas correspondem aos aminoácidos homólogos entre as duas isoformas, e as bolinhas vermelhas correspondem aos aminoácidos heterólogos.

GLUT4 é o chamado transportador de glicose insulino-sensível, cujo principal papel é proporcionar a captação de glicose insulino-mediada em tecidos

adiposo e muscular, tecidos que expressam especificamente, mas não unicamente, a proteína GLUT4. Modificações na expressão deste gene, tanto em tecido adiposo quanto em músculo esquelético, correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica. Nas células em repouso, o GLUT4 localiza-se principalmente no compartimento intracelular. O estímulo insulínico determina a movimentação de GLUT4 deste compartimento, e sua translocação em direção à membrana plasmática agudamente aumenta a captação de glicose, participando de forma importante no controle da homeostase glicêmica em nível tecidual e plasmático em estado pós-prandial <sup>(18)</sup>.

A resistência à insulina é um estado metabólico no qual concentrações fisiológicas de insulina produzem menor resposta biológica, reduzindo drasticamente a captação de glicose em tecidos periféricos e resultado em aumento de produção de glicose hepática. A redução na sensibilidade à insulina em hepatócitos, fibra muscular e adipócito é um estímulo para aumento na produção e secreção pancreática de insulina com finalidade de manter a glicemia. Cronicamente isto gera uma hiperinsulinemia e até descompensação pancreática total (exaustão das células beta), o que contribui para o aparecimento de diabetes tipo 2 <sup>(20)</sup>.

O estado de resistência à insulina (RI) é uma característica da Síndrome Metabólica (SM) e diabetes tipo 2 (DM2) e envolve tecidos-alvos, tais como, tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. Os mecanismos patogênicos que impedem a ação da insulina nesses tecidos e os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da Síndrome Metabólica não foram ainda completamente elucidados <sup>(21)</sup>.

Sabe-se que no nível celular, a resistência à insulina está associada a uma piora na via de sinalização insulínica ou a redução da expressão do transportador de glicose GLUT4 ou alteração na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática ou em duas ou mais associações destes eventos, o que, em última instância, provoca menor ação biológica do hormônio, e alteração da homeostasia glicídica <sup>(22)</sup>.

O aumento da glicemia via gliconeogênese hepática, aliada à menor utilização da glicose face ao predomínio de AGL no metabolismo oxidativo,

proporciona um aumento exacerbado da glicose sanguínea, o que acarreta uma produção excessiva de insulina. Essa situação pode gerar resistência à insulina devido a várias alterações em mecanismos intracelulares, como diminuição da concentração e da atividade quinase do receptor de insulina, da concentração e da fosforilação do IRS-1 e -2, da atividade da PI 3-quinase, da translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) e da atividade das enzimas intracelulares <sup>(17)</sup>.

A translocação de transportadores estimulada pela insulina representa o principal mecanismo pelo qual a insulina estimula agudamente o transporte de glicose nas células. Como já foi mencionada, esta etapa envolve a ativação da PI(3)K. Entretanto, há também uma via independente da ativação da PI(3)K e estudos têm demonstrado que o exercício tem um efeito estimulador na translocação de GLUT4 mesmo na ausência da insulina atuando por esta via <sup>(23,24,25)</sup>.

### **1.3. Tabagismo e Resistência à insulina**

Um crescente corpo de evidências indica que o tabagismo está associado com um quadro de resistência à insulina e diminuição da tolerância à glicose <sup>(26)</sup>. A literatura atual aponta uma relação dose-resposta existente entre tabagismo e desenvolvimento de diabetes tipo II em adultos <sup>(27,28)</sup>.

O tabagismo altera o metabolismo em vários aspectos que podem afetar a sensibilidade à insulina. O fumo está associado com aumento da gordura abdominal (maior relação cintura-quadril) <sup>(28,29,30)</sup> aumento de ácidos graxos livres (AGL) e mobilização de glicerol, quadro de dislipidemias (aumento de LDL - Low Density Lipoprotein e diminuição de HDL – High-density lipoprotein), disfunção endotelial, aumento na viscosidade sanguínea, estado de hipercoagulabilidade e diminuição da sensibilidade à insulina <sup>(10, 26, 31, 32)</sup>.

*In vitro*, o tabagismo está associado a um nível superior de vários marcadores inflamatórios, como da proteína C-reativa, das interleucinas (IL-1, IL-6, IL-1B) e do fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) em fumantes <sup>(10)</sup>. Há

evidências de que um processo inflamatório crônico poderia representar o fator desencadeante na origem da resistência insulínica e eventualmente até do aparecimento de diabetes tipo 2 <sup>(33)</sup>.

O tabagismo provoca inflamação das vias aéreas e inflamação sistêmica de baixo grau <sup>(34)</sup> pela ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, que liberam proteases e espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas moléculas são geradas em situações clínicas onde microambientes de hipóxia são seguidos por microambientes de reoxigenação. As células também produzem EROS devido a enzimas oxidantes (aldeído oxidase, flavina desidrogenase NADPH oxidase, etc.), auto-oxidação de pequenas moléculas (catecolaminas, flavinas e hidroquinonas) e sistema de carregadores de elétrons microssomais e das membrans nucleares, entre outras <sup>(35)</sup>.

O aumento do estresse oxidativo leva a ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis, como o fator nuclear-kB (NF-kB) e ativador protéico-1 (AP-1), que são críticos para a transcrição de citocinas pró inflamatórias tais como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) <sup>(36)</sup>.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, com diversas funções metabólicas e endócrinas e que participam da inflamação e resposta do sistema imunológico <sup>(37)</sup>. A literatura aponta que a secreção de citocinas pró-inflamatórias participa na gênese da resistência à insulina<sup>(38)</sup>. SPRANGER e colaboradores <sup>(39)</sup> mostraram que uma reação inflamatória subclínica, como a que pode ser causada pelo tabagismo, com presença de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  tem um papel importante da patogênese do diabetes tipo 2.

Estudos mostraram que o TNF- $\alpha$  tem um importante papel como mediador da resistência à insulina <sup>(40)</sup>. Ações diretas do TNF- $\alpha$  em células insulino-sensíveis têm sido mostradas em dois sistemas de importante relevância: a transdução do sinal insulínico e o transportador de glicose GLUT4. Na transdução do sinal insulínico, o TNF- $\alpha$  age bloqueando a ação da insulina através da inibição da atividade tirosina-quinase da subunidade beta e da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1). Quanto ao GLUT4, isoforma transportadora de

glicose insulino-responsiva, TNF- $\alpha$  pode fazer uma “downregulation” de RNAm do GLUT4 em adipócitos e miócitos <sup>(41,42)</sup>.

O aumento de marcadores inflamatórios está relacionado à resistência à insulina pelo aumento da fosforilação do IRS-1 em serina por meio de proteínas como a cinase inibidora do fator nuclear kB (Ikkb), a cinase c-jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) prejudicando a captação de glicose insulino-estimulada e atrapalhando a translocação do GLUT4 <sup>(43)</sup>.

HOUSTON e colaboradores<sup>(44)</sup> num estudo epidemiológico mostraram que a própria fumaça do cigarro pode causar intolerância à glicose, o que é precursora de diabetes e doença aterosclerótica. Encontraram forte associação entre exposição à fumaça do cigarro e incidência de intolerância à glicose durante estudo longitudinal de 15 anos, sendo 22 % entre os fumantes e 17% entre os não-fumantes expostos à fumaça. Além disso, demonstraram que os não-fumantes com exposição passiva à fumaça do cigarro apresentavam maior risco de desenvolver intolerância à glicose comparados àqueles não-fumantes e sem exposição passiva ao cigarro.

O hábito de fumar também tem sido associado ao risco de pancreatite crônica e de câncer pancreático, sugerindo que o fumo pode ser diretamente tóxico para o pâncreas e conduzir ao diabetes <sup>(45)</sup>. O mecanismo pelo qual o tabagismo contribui para a lesão do pâncreas é ainda desconhecido, mas estudos apontam que a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal em virtude da exposição à nicotina resulta em elevados níveis de liberação de cálcio intracelular o que pode ser responsável por citotoxicidade e lesão celular<sup>(46)</sup>.

Outro efeito agudo do cigarro é o aumento da atividade do sistema nervoso simpático e dos níveis de catecolaminas circulantes. A estimulação adrenérgica associada ao fumo não tem origem central, nem depende da estimulação da transmissão simpática ganglionar. O fumo age em sítios simpáticos periféricos aumentando a liberação de catecolaminas de tecidos cromafins e/ou reduzindo a re-captção e o clearance destas substâncias<sup>(47)</sup>. Estudos demonstram também que a nicotina presente no cigarro atua no sistema nervoso simpático causando vasoconstrição e hipóxia tissular<sup>(48)</sup> e existem evidências apontando tanto prejuízo

quanto melhora da ação insulínica em resposta a hipóxia. A vasoconstrição periférica durante o ato de fumar pode ser um dos mecanismos pelos quais o tabagismo leva a uma reduzida captação de glicose<sup>(49)</sup> e a hipóxia intermitente, produzida pelo fumo, estimula a liberação de hormônios contra regulatórios que podem neutralizar a ação da insulina e alterar o metabolismo da glicose<sup>(50,51)</sup>.

Assim, alguns trabalhos demonstram que a hipóxia aguda pode causar intolerância a glicose e resistência a insulina<sup>(52,53,54)</sup>. Em relação aos diabéticos insulino-dependentes, admite-se que a vasoconstrição cutânea induzida pela nicotina, diminua e/ou retarde a absorção da insulina, exigindo maiores doses em fumantes e diminuição das doses com a suspensão do cigarro<sup>(15)</sup>.

Por outro lado, assim como ocorre na atividade contrátil, a hipóxia também pode propiciar aumento na captação de glicose pelo músculo esquelético<sup>(55)</sup>. Apesar da insulina e contração muscular estimularem o transporte de glicose nas células musculares por vias de sinalização independentes, a hipóxia parece operar por intermédio da mesma via utilizada pela contração muscular, demonstrando que o sistema efetor para o transporte de glicose via hipóxia encontra-se íntegro em músculo esquelético de indivíduos portadores de diabetes mellitus<sup>(56)</sup>.

#### **1.4. Exercício e Resistência à Insulina**

A associação entre inatividade física e resistência à insulina foi sugerida pela primeira vez em 1945<sup>(57)</sup>. Desde então, estudos transversais e de intervenção têm demonstrado relação direta entre atividade física e sensibilidade à insulina<sup>(58)</sup>.

Tem sido demonstrado que uma única sessão de exercício físico aumenta a captação de glicose mediada pela insulina em sujeitos normais, em indivíduos com resistência à insulina parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 2, em obesos com resistência à insulina, bem como em diabéticos do tipo 2<sup>(58)</sup>.

Numerosos fatores metabólicos e hemodinâmicos podem contribuir para a melhora na homeostase glicídica proporcionada pelo exercício. Dentre eles podemos mencionar a melhora na ação insulínica, especialmente no músculo

esquelético, estimulação hormonal reduzida da produção de glicose hepática, aumento na atividade da glicogênio-sintase, aumento da densidade capilar e melhora do fluxo sanguíneo no músculo, normalização do perfil lipídico sanguíneo, aumento na atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas, aumento das fibras musculares mais sensíveis à ação insulínica e aumento da expressão e translocação de GLUT4 para a membrana plasmática <sup>(59,60)</sup>.

Estudos apontam que o exercício pode aumentar a expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose GLUT4 na musculatura esquelética <sup>(61,62)</sup>. Vários trabalhos apontam que o exercício físico aumenta a expressão da proteína e do RNAm do GLUT4 e que pode ser um dos mecanismos responsáveis na melhora da resistência à insulina <sup>(63,64,65)</sup>.

A combinação de insulina e exercício resulta em efeitos aditivos em relação ao transporte de glicose associado ao recrutamento do transportador GLUT4 para a membrana plasmática, o que confirma as hipóteses sugeridas sobre a estimulação de dois mecanismos diferentes nos quais haveria duas localizações de “pools” intracelulares distintos de transportadores de glicose, ou seja, um que responde ao exercício e outro que responde à insulina <sup>(66)</sup>.

Diversos mecanismos são propostos como envolvidos no transporte de glicose mediado pela contração muscular. Estudos mostram que a proteína cinase ativada por AMP (AMPK) é uma mediadora do transporte de glicose estimulado pelo exercício <sup>(25,67)</sup>. A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança da carga energética celular. O papel da AMPK no metabolismo celular é a manutenção da homeostasia energética. Todas as células vivas devem continuamente manter alta relação entre ATP e ADP para sobreviver. Isso é obtido por intermédio do anabolismo que aumenta a energia celular convertendo ADP e fosfato em ATP, enquanto o catabolismo diminui o componente energético celular, por converter ATP em ADP e fosfato. Convém ressaltar o fato de que a relação ATP–ADP nas células geralmente permanece quase constante, indicando que o mecanismo que regula esse processo é muito eficiente. A AMPK é um componente-chave desse equilíbrio



fisiológico <sup>(68)</sup>. A AMPK é ativada por um aumento na relação intracelular AMP/ATP e creatina/fosfocreatina via um complexo mecanismo que envolve modificações alostéricas e fosforilações <sup>(25)</sup>. Uma vez ativada, a AMPK exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios, sobre expressão gênica e sobre síntese protéica <sup>(68)</sup>.

Esse aumento da atividade da AMPK em resposta a uma necessidade de gerar ATP, durante o exercício, promove a translocação das vesículas contendo GLUT4, facilitando assim o transporte de glicose para o músculo de maneira semelhante à da insulina embora por cascatas de sinalização diferentes e independentes <sup>(23)</sup> (Fig.03).

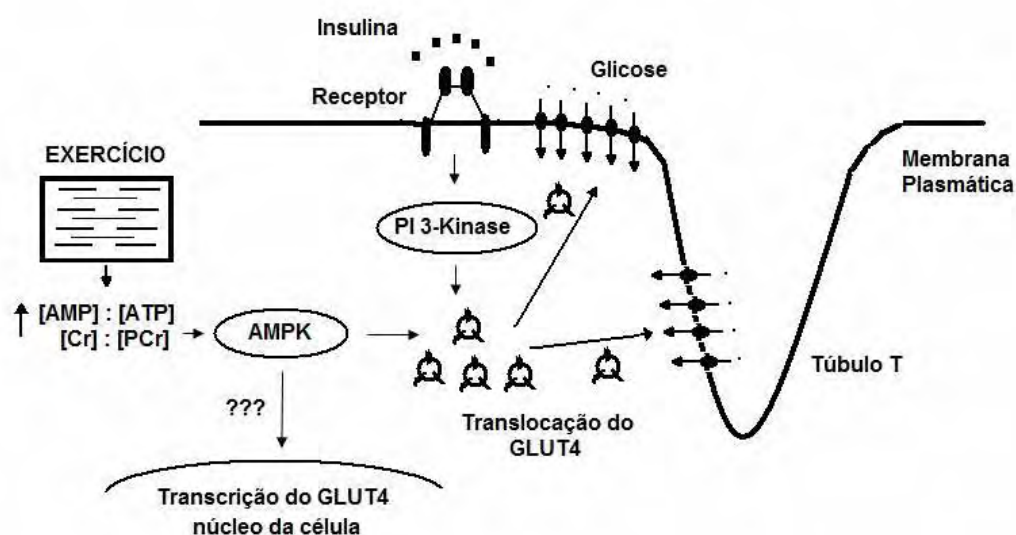


Fig. 03 – Mecanismo proposto através do qual o exercício aumenta a captação da glicose no músculo esquelético <sup>(24)</sup>.

A liberação de cálcio das cisternas do retículo endoplasmático liso, no momento da despolarização, necessária à interação dos miofilamentos de actina e miosina, também atua como mediador do transporte de glicose <sup>(23,66)</sup>. O mecanismo pelo qual o cálcio pode regular o transporte de glicose exercício-estimulado não é conhecido. No entanto, é improvável que íons cálcio possam ativar o sistema de transporte de glicose diretamente, uma vez que, as

concentrações citoplasmáticas de cálcio são elevadas por apenas uma fração de segundo depois de cada contração muscular, enquanto que o aumento na captação de glicose muscular pode permanecer elevada por um período de tempo considerável após a cessação da atividade contrátil. A elevação na concentração de cálcio intracelular, então, pode iniciar ou facilitar a ativação de moléculas ou cascatas de proteínas sinalizadoras intracelulares, propiciando dos efeitos imediatos e prolongados do exercício no transporte de glicose para o tecido muscular.

Assim, uma ou mais proteínas intracelulares calcio-reguladas podem levar à translocação do GLUT4. Os candidatos potenciais incluem calmodulina, a família de proteínas cinases dependentes de calmodulina (CaMK), e a família de proteínas cinase C (PKC), que são todos importantes intermediários na transdução do sinal celular <sup>(25)</sup>.

O óxido nítrico (NO), por intermédio da elevação da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) pelo exercício crônico, também é citado como um dos fatores que podem atuar na translocação do GLUT4. Sua ação pode se dar por intermédio de via parácrina e/ou autócrina, conduzindo à ativação de moléculas sinalizadoras e subsequente a translocação do GLUT4 <sup>(69)</sup>.

Nota-se, portanto evidências da participação de mais de um mecanismo na translocação do GLUT4 pela atividade contrátil, possibilitando o advento de uma ação sinérgica. De fato, WRIGHT e colaboradores <sup>(70)</sup>, verificaram que tanto o cálcio quanto a AMPK encontram-se simultaneamente envolvidos com a estimulação do transporte de glicose pela atividade contrátil.

O exercício físico pode também aumentar a transcrição do GLUT4 <sup>(71,72)</sup>. Estudos *in vitro* mostram que a contração muscular é capaz de aumentar rapidamente o conteúdo de RNAm do GLUT4 e que isto é acompanhado por um aumento de fatores transcricionais <sup>(73)</sup>. Verificam-se duas regiões promotoras importantes para a o aumento do GLUT4 no músculo esquelético durante o exercício. A primeira região contém sítios de ligação para o *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) e a segunda região contém domínio de ligação para o GLUT4 *enhancer factor* (GEF). Os mecanismos pelos quais estes fatores transcricionais

atuam no aumento da expressão do GLUT4 ainda não foram elucidados, mas estudos sugerem que a ativação da AMPK durante a contração muscular pode iniciar uma cascata de eventos que implica na regulação do gene deste transportador <sup>(74)</sup>.

O músculo esquelético, que representa aproximadamente 40% da massa corporal, é o principal tecido responsável pela captação e estocagem de glicose <sup>(75)</sup>, e o GLUT4 é o transportador de glicose mais importante e abundante na musculatura. As unidades motoras da musculatura podem ser denominadas de acordo com alguns parâmetros em que diferem. Assim, podem ser classificadas em três categorias distintas: tipo I (fibras vermelhas, oxidativas e de contração lenta), tipo IIa (fibras intermediárias, oxidativo-glicolíticas e de contração rápida) e tipo IIb (fibras brancas, glicolíticas e de contração rápida) <sup>(76)</sup>.

Já é bem estabelecido na literatura que as unidades motoras apresentam expressão diferenciada do transportador de glicose GLUT4 <sup>(77)</sup>. O GLUT4 apresenta-se mais expresso em fibras do tipo I e IIa, tanto na membrana quanto em vesículas intracelulares, quando em comparação com as fibras do tipo IIb <sup>(78,79)</sup>. Isso porque as unidades motoras I e IIa, durante a atividade contrátil, utilizam preferencialmente a glicose que estará sendo captada naquele momento, do que aquela estocada na forma de glicogênio dentro do músculo e, portanto, tornando relevante apresentar uma maior expressão de GLUT4. Por outro lado, a unidade motora IIb depende mais diretamente da glicose estocada na forma de glicogênio muscular <sup>(80)</sup>.

O tecido muscular esquelético sóleo é constituído principalmente por fibras musculares vermelhas, de contração lenta, oxidativa, do tipo I, enquanto que o músculo extensor longo dos dígitos (EDL) é constituído predominantemente por fibras brancas, de contração rápida, glicolíticas do tipo IIB.

No coração com oxigenação normal, os AGL são a principal fonte de energia, seguidos da glicose, lactato, cetonas e aminoácidos, que representam rápida adaptação dos cardiomiócitos de acordo com o substrato presente em maior abundância. A glicose é o principal substrato utilizado na isquemia, sobrecarga de trabalho e de pressão. Assim como no músculo esquelético, seu

transporte é realizado principalmente pelo GLUT4, cuja translocação do citosol à membrana plasmática é especialmente estimulada pela contração continuada dos cardiomiócitos, representando a insulina importante estímulo adicional nesse processo<sup>(18)</sup>. O diabetes, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca são estados fisiopatológicos no qual expressão de GLUT4 encontra-se alterada no coração.

Diante dos fatos apresentados, torna-se relevante investigar os processos que podem estar envolvidos na gênese da resistência insulínica em virtude do tabagismo e os efeitos do exercício físico associado a este quadro. Considerando-se que a quantificação da expressão do GLUT4 tem-se mostrado uma ferramenta de grande utilidade clínica, uma vez que, conhecendo melhor sua expressão podemos fornecer medidas terapêuticas para as doenças metabólicas como o diabetes tipo 2, este trabalho buscou ampliar novos conhecimentos sobre a regulação da expressão da proteína GLUT4.

**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- 1) Avaliar o efeito do tabagismo passivo sobre a sensibilidade à insulina em ratos machos Wistar de 4 meses de idade;
- 2) Avaliar o efeito do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina de ratos machos Wistar fumantes passivos de 4 meses de idade;
- 3) Quantificar conteúdo de proteína e de RNAm do transportador de glicose GLUT4 em tecidos insulino-sensíveis tais como coração, músculos esqueléticos solear (oxidativo) e extensor longo dos dígitos (glicolítico) de ratos fumantes sedentários e exercitados de 4 meses de idade.



### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Animais de experimentação.**

Para a realização dos experimentos foram utilizados 82 ratos machos, da linhagem Wistar, livres de patógenos específicos, com idade entre 45 à 60 dias, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP - Campus de Presidente Prudente, alocados em gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola) medindo 30x16x19 centímetros, a temperatura média de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Esses animais foram alimentados com ração padrão e água de torneira fornecida *ad libitum*.

Este estudo obedeceu aos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT/UNESP), processo 262/2008.

#### **3.2 Caracterização do sistema de inalação**

O modelo de inalação utilizado foi o descrito em 1994 por Cedon-Filha <sup>(81)</sup> com adequações do espaço para a gaiola e válvulas realizadas pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Presidente Prudente – SP.

Como câmara de inalação (Fig. 5A e 5B) foi utilizada uma caixa com estrutura de alumínio e vidro, medindo 100x44x44 centímetros. A câmara era fechada e dividida em dois compartimentos, por uma placa de vidro escuro com 5 furos. Um dos compartimentos da caixa foi utilizado para a colocação de cigarros acesos em um suporte, de forma que ficassem na posição vertical. Outro compartimento foi destinado à exposição dos animais comportando uma gaiola com 10 (dez) animais.



No compartimento em que ficavam os cigarros, foi conectada à câmara, uma fonte de ar comprimido com fluxo de 10 L/min permitindo a combustão dos cigarros e propiciando a condução da fumaça para o outro lado da caixa, onde estavam os animais, dentro da gaiola. No compartimento dos animais havia um orifício de drenagem de ar, por onde a exaustão da mistura era realizada. Desta forma, o arranjo experimental aproxima-se mais propriamente de uma situação de fumo passivo.

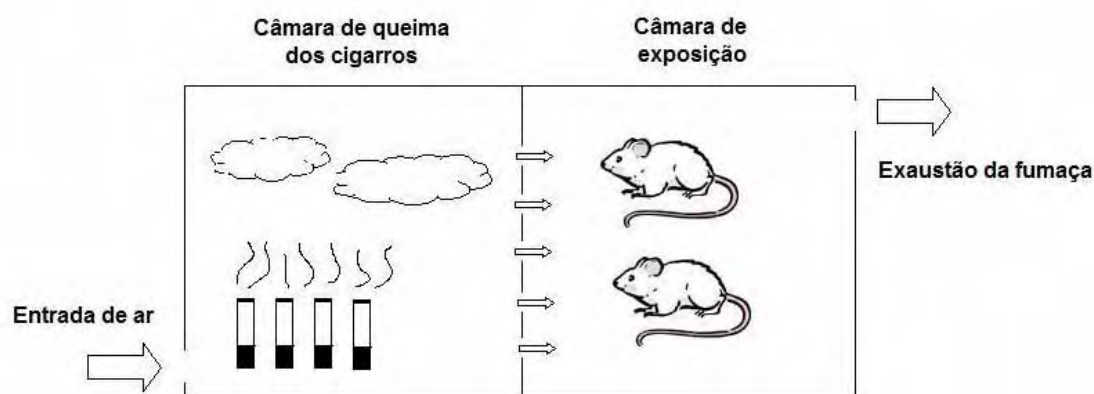


Fig. 04 – Desenho esquemático da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça



Fig. 05 – Vista externa da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça.

### 3.3 Caracterização da Esteira Rolante

A esteira rolante para animais de pequeno porte utilizada nesta pesquisa foi construída pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Presidente Prudente, baseada no modelo apresentado por ANDREW em 1965<sup>(82)</sup>.

A esteira apresentava dois roletes com distância definida entre si, onde por eles deslizava uma lona provocando assim, o movimento induzido do animal em estudo. Os eixos eram acionados por um motor de 12 volts com rotação variável a fim de atribuir uma velocidade ajustável entre 0 a 10m/min. Oito pistas foram elaboradas para o treinamento dos animais. A metade anterior de cada uma das pistas tinha suas laterais pintadas de preto, sendo cobertas por madeira, fazendo com que essa região fique completamente escura. Essa medida é necessária, pois os animais tendem a fugir, procurando locais escuros<sup>(83)</sup>.

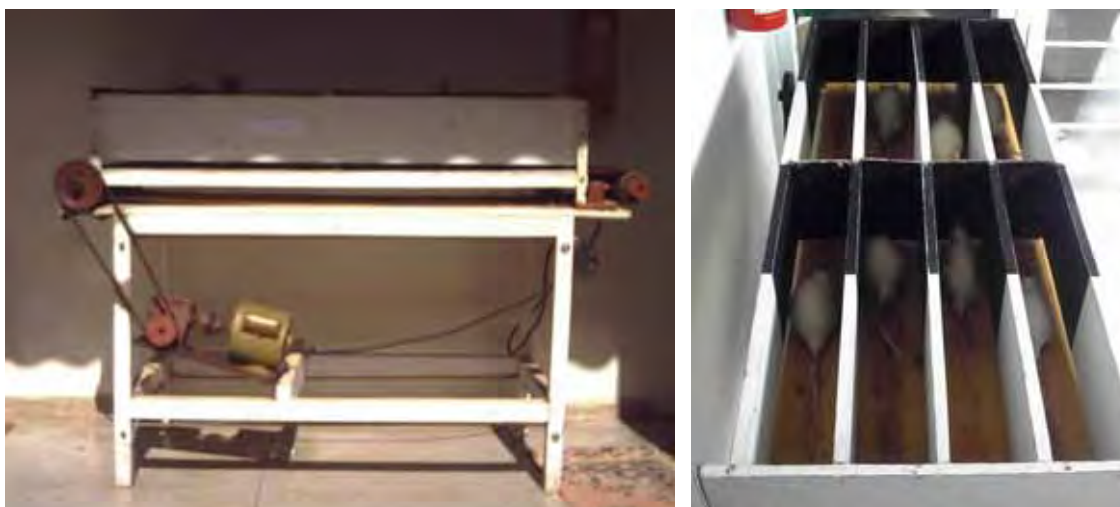


Fig. 06 – Esteira rolante para animais de pequeno porte, vista externa e interna.

### **3.4 Grupos de experimentação**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados animais divididos aleatoriamente em quatro grupos, discriminados a seguir:

- CS: grupo controle sedentário – composto por animais não expostos à fumaça de cigarro e não submetidos ao treinamento físico.
- CE: grupo controle exercitado – composto por animais exercitados em esteira rolante;
- FS: grupo fumante sedentário – composto por animais expostos a fumaça de cigarro e sedentários;
- FE: grupo fumante exercitado – composto por animais submetidos à exposição da fumaça de cigarro e ao protocolo de exercício físico em esteira rolante;

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.

### **3.5 Protocolos de Experimentação.**

Os animais em estudo foram submetidos a um protocolo de exposição à fumaça de cigarro e treinamento físico que compreendeu duas fases: adaptação e experimental.

Na fase de adaptação que compreendeu os cinco primeiros dias de experimento, os animais dos grupos FS e FE foram expostos à fumaça de 2 cigarros por 10 minutos, uma vez ao dia e os integrantes dos grupos CE e FE foram submetidos a sessões de treinamento físico em esteira rolante a uma velocidade de 9,75 metros por minuto, com duração de 15, 30, 45, 55 e 60 minutos, respectivamente.

A fase experimental consistiu na exposição dos animais dos grupos FS e FE à fumaça da combustão de 4 cigarros, durante 30 minutos, duas vezes ao dia, cinco dias por semana, durante 60 dias corridos. Esta dose, que totaliza 8 cigarros ao dia, foi determinada a partir de experimentos prévios que relataram ser esta a dose suportada pelos animais e pelos relatos de PAIVA e colaboradores<sup>(84)</sup> e de CASTERDELI e seus colaboradores<sup>(85)</sup> que preconizam um número reduzido de cigarros, devido ao risco maior de mortalidade dos animais em decorrência de um segundo fator estressante (exercício).

Os animais dos grupos CE e FE foram submetidos a sessões em esteira rolante, a uma velocidade de 9,75 metros por minuto, com duração de 60 minutos cada sessão, durante 60 dias corridos com intervalo nos finais de semana. Este protocolo caracteriza um exercício físico moderado tipo caminhada.

Os animais de todos os grupos permaneceram no biotério sob as mesmas condições e foram sacrificados com 60 dias a contar da data do início do experimento.

### **3.6. Avaliação da sensibilidade à insulina: ITT (Teste de tolerância à insulina)**

Para a avaliação da sensibilidade a insulina “*in vivo*”, foi realizado um teste de tolerância à insulina (ITT). O teste consiste na administração de insulina regular, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose ao longo de 20 minutos. Esta queda da glicose é determinada por dois fatores: supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis. A interpretação do ITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível o indivíduo é à insulina. Quanto maior a constante de decaimento da glicose (kITT), maior a sensibilidade à insulina.

**CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:** Uma semana antes do sacrifício, 6 animais de cada grupo foram anestesiados intraperitonealmente (Cloridrato de quetamina e Cloridrato de Xilazina com dose de 60mg/Kg de peso corporal) e quando necessária, a anestesia foi completada com éter etílico. Foi realizada

pequena secção na extremidade distal da cauda dos animais para realização das coletas das amostras de sangue. A primeira coleta foi realizada antes da administração de insulina (basal). Foi administrada 0,5 UI / Kg de peso corpóreo de uma solução de insulina regular (Novolin 100U / ml) com salina 0,9% + BSA 0,25%. As coletas de sangue foram realizadas, nos tempos basal (0 minuto), cinco, dez, quinze e vinte minutos, após a administração de insulina. A glicemia foi verificada por meio de glicofitas e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil). Esse procedimento foi realizado sempre no período da tarde para que não houvesse interferência na sensibilidade insulínica dos animais e foi executado de forma idêntica para todos os grupos. Posteriormente, foi calculada a constante de decaimento (kITT, %/min.) a partir da regressão linear das concentrações de glicemia obtidas durante o teste <sup>(86)</sup>.

### **3.7. Obtenção de amostras de sangue e tecidos**

Após 24 horas da última sessão de treinamento os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (0,3ml) e Cloridrato de Xilazina (0,3ml) numa dose de 60mg/Kg de peso corporal via intraperitoneal para a obtenção das amostras de sangue e tecido.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia mediana, a veia cava inferior foi exposta e o sangue foi coletado e mantido em 4<sup>o</sup>C até centrifugação a 1.600 rpm, durante 15 minutos, para a obtenção do soro, o qual foi estocado em -20<sup>o</sup>C para posterior determinação do perfil sérico. Foi coletada também uma gota de sangue da veia caudal para análise da glicemia de jejum por meio de glicosímetro e glicofitas.

Em seguida, enquanto o animal ainda estava vivo, procedeu-se a dissecação dos músculos sóleo (oxidativo - fibras musculares tipo I), extensor longo dos dígitos (EDL) (glicolítico – fibras musculares tipo II) e músculo cardíaco. Imediatamente após a retirada, os tecidos musculares foram pesados, identificados e congelados em nitrogênio líquido e guardados em freezer -70<sup>o</sup>C para posterior análise.

### **3.8. Quantificação de Proteínas do Transportador de Glicose GLUT4**

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

#### **3.8.1. Preparação das Amostras para o Western Blotting**

Para a técnica de Western Blotting foi realizado o processo de fracionamento de membranas celulares em membrana plasmática (PM) e microssomal (M), para tecido muscular esquelético (sóleo e EDL), e em membranas totais (MT), para tecido muscular cardíaco. Para isso os tecidos musculares foram homogeneizados em tampão TRIS HCl 10mM; EDTA 1mM, sacarose 250mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) e centrifugados a 760g durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (760g) por 10 minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes juntos foram submetidos à uma centrifugação a 31.000g durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento, correspondendo à fração plasmática (PM), foi ressuspenso em 400 µL de tampão de homogeneização e estocado a –20°C até a utilização. O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação (190000g) durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento, correspondente à fração microssomal (M), foi ressuspenso em 300 µL de tampão de homogeneização e estocado a –20°C até a utilização<sup>(20,87,88)</sup>.

Outro fracionamento para obtenção de um conjunto de membranas totais (fração de membranas totais - MT), utilizado para o coração envolve, resumidamente, uma centrifugação a 1000g durante 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1000g) por 10 minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes foram somados e então submetidos à uma ultracentrifugação a 150000g durante 75 minutos, a 4°C. O sedimento,

correspondendo à fração de membranas totais (MT), foi ressuspenso em 600µL de tampão de homogeneização e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização <sup>(20)</sup>.

### 3.8.2. Método Lowry para dosagem de proteína

A concentração de proteína total das diferentes frações de membranas celulares foi avaliada através do método de LOWRY <sup>(89)</sup>.

Foram acrescentados em 100 µL de amostra, dois mL de solução C (solução A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  189 mM, NaOH 100 mM, Tartarato de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  0,7 mM adicionada de solução B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  16 mM, numa proporção de 50 volumes de solução A: 1 volume de solução B. Após 10 minutos de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , adicionou-se a solução de Folin Ciocalteau (75 µL). Após 30 minutos de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , a concentração de proteína foi avaliada por leitura em espectrofotômetro (670 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,05 a 1,0 mg / mL. Os valores de concentração protéica das amostras de frações de membranas foram aferidos nesta curva de calibração.

### 3.8.3. Western Blotting – Quantificação de proteína GLUT4

Conhecidas as concentrações protéicas das diferentes amostras de tecido, estas foram submetidas ao método de “Western Blotting” para a quantificação do transportador de glicose GLUT4. O método envolve os seguintes passos:

#### Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O primeiro passo do Western Blotting consiste em submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nestas frações protéicas. Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por GARFIN <sup>(90)</sup>, o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de empacotamento (“stacking gel” - Acrilamida 5,8%; Bisacrilamida

0,16%; Tris 0,5M pH 6,8; EDTA 8mM; SDS 0,1% TEMED 0,05%; persulfato de amônio 0,06%) e o gel de separação (“resolving gel” - Acrilamida 9,7% Bisacrilamida 0,3%; Tris 1,5 M pH 8,9; EDTA 8mM; SDS 0,125%, TEMED 0,05% persulfato de amônio 0,05%). Amostras de frações de membrana (20-30µg de proteína / lane, dependendo do tecido) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05M, Bromophenol Blue 0,05%, SDS 9%, 2-Mercaptoetanol 6%) e, então, submetidas a fervura durante 5 minutos. Após fervura as amostras foram resfriadas e aplicadas no sistema de corrida (gel).

A eletroforese vertical foi iniciada sob voltagem constante em 75 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que podia ser observado na transição dos dois géis (aproximadamente 1h e 30min). Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante de 55mA para a corrida no gel de separação (aproximadamente 4h e 30min), utilizando-se como tampão de corrida Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3.

Juntamente com as amostras sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores), o que facilitava a localização da proteína desejada para o estudo.

#### Transferência eletroforética

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

A transferência foi realizada sob corrente constante de 42mA, em temperatura de 4°C por 16 horas, utilizando-se como tampão de transferência Tris 12,5 mM, Glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Comassie. Esta metodologia é baseada em TIMMONS & DUNBAR<sup>(91)</sup>.

#### Imunodeteccção (Immunoblotting) - ECL (Enhanced Chemiluminescence)

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodeteccção<sup>(92)</sup>. Primeiramente, realizou-se um bloqueio inespecífico com leite



desnatado – 23g de leite em 100ml de PBS 1X (NaCl 0,8%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>[12H<sub>2</sub>O] 0,115%, KCl 0,02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02%) durante 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-GLUT4 (antisoro comercial de coelho - Chemicon International, Temecula, Califórnia) com diluição de 1:3000 em PBS 1X + BSA 8%), durante 3 horas a 37°C. Posteriormente a membrana recebeu série de lavagens com 10 ml de solução de lavagem (PBS 1X + 0,1% Tween 20). Em seguida foi feita uma incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:6000, em solução bloqueadora (1g de leite em pó + 20 ml de PBS 1X + 0,05% de Tween 20) durante 1 hora. A membrana foi lavada vigorosamente com solução de lavagem e colocada em contato com solução de detecção (H<sub>2</sub>O destilada + Luminol + Ác. P-Cumárico + Tris 1M [pH 8,5] + Peróxido de Hidrogênio) por 1 minuto. Por fim, a membrana foi exposta a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1,5 a 3 minutos para detecção das bandas resultantes. Após este período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora (KODAK), sendo evidenciados os “blots” correspondentes à proteína transportadora GLUT4.

### Expressão dos resultados

O Filme foi fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o software Scion Image for Windows (Scion Corporation, EUA).

A intensidade dos “blots” e os resultados em cada membrana foram normalizados considerando-se 100% o valor obtido pelo grupo controle (CS) e ou fumante sedentário (FS) dependendo da análise.

Os resultados obtidos a partir desta análise densitométrica foram então expressos em:

- Unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/μg), calculado a partir da divisão entre área estimada do blot (cálculo do número de pixels da

imagem) pela quantidade de proteína aplicada na eletroforese, que representa a tradução efetiva do RNAm em proteína;

- Conteúdo total de GLUT4 que é a concentração de proteína total (UA/  $\mu\text{g} \times \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) aplicada na eletroforese multiplicada pela recuperação protéica ( $\mu\text{L}$ ) em cada preparação de amostra representando a quantidade de transportador que realmente está captando glicose no organismo expresso em UA;
- Conteúdo total de GLUT4 dividido por grama de peso tecidual que reflete a capacidade do tecido em depurar a glicose sanguínea (UA/g de tecido);
- Conteúdo de GLUT4 dividido por grama de peso corpóreo que representa a participação de cada tecido na utilização de glicose do organismo como um todo (UA/g de peso corporal).

Ainda foi feita a somatória das quantidades totais de GLUT4 presentes nas frações de membrana plasmática e de microsoma de baixa densidade de todo o tecido, correspondendo ao total de GLUT4 translocável e que pode efetivamente participar como captador de glicose no tecido. E também foi calculado um fator de translocação da proteína transportadora GLUT4 para a membrana plasmática, calculado pela relação entre a quantidade total de GLUT4 presente na membrana plasmática e a somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática e microsomal.

### **3.9. Quantificação do RNAm do transportador de glicose GLUT4**

Para a quantificação do gene GLUT4 utilizamos a técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*).

#### **3.9.1. Extração de RNA total**

As amostras de tecidos musculares foram homogeneizadas em Homogeneizador modelo OMNI TH - USA (Lodan) com TRIZOL Reagente <sup>®</sup>

(Invitrogen, EUA) para extração de RNA total (proporção: 0,1 g de tecido / 1mL de Trizol). Após a homogeneização a amostra foi centrifugada a 12.000rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e recebeu 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos foram então agitados vigorosamente por 15s, incubados durante 3 min em temperatura ambiente e novamente centrifugados a 12.000rpm, durante 15 minutos, a 4°C. Foi adicionado 0,5ml de isopropanol a fase superior, transferida para novo tubo, logo após foram agitados por inversão 20 vezes e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Então foi feita uma centrifugação a 12.000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% e submetido a uma centrifugação de 12.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco em temperatura ambiente durante 20 minutos. A cada tubo foi adicionado 50µL de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) para solubilização do precipitado em banho maria a 65°C.

Posteriormente, foi feita a avaliação da concentração de RNA total utilizando-se 1 µL da amostra solubilizada de RNA adicionado a 79 µL de água DEPC para leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, Amersham Biosciences, GE Healthcare) em 260 nm. Essa leitura permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40µg/mL de fita simples e a relação DO260/DO280, permite estimar a pureza do ácido nucléico da amostra.

### **3.9.2. RT-PCR: Semi-Quantificação do RNAm do GLUT4:**

#### Obtenção da cDNA a partir do RNA total:

Amostras de 5µg de RNA total extraído dos ventres musculares e coração foram submetidas à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm (DNAc). Para isto, adicionou-se em cada amostra: tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), primers randômicos (150ng), inibidor de RNase (40U) e a enzima M-MLV

Reverse Transcriptase (200U/ul; Invitrogen®, EUA), em volume final de 20 µL. Inicialmente os RNAs foram desnaturados a 65 °C por 5 minutos e a seguir incubados por 60 min a 42°C na presença da enzima. Após este período as reações foram incubadas a 70 °C por 15 min para desnaturação da enzima. Ao final da reação, os produtos foram diluídos com H<sub>2</sub>O estéril até o volume final de 50 µL. As incubações foram realizadas por meio de banhos monitorados por termômetro.

*PCR para amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4 e da β-actina:*

Para isso, utilizou-se alíquotas de 1 µL do produto final de RT-PCR (cDNA), juntamente com 10 pmol/ µL de *primers específicos* do GLUT4 (Sense: 5'- CCCCTCCAGGGCAAAGGAT - 3'; Antisense: 5'-TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3' - Tamanho: 203 pb; temperatura de anelamento: 54°C, número de ciclos: 28), e do gene da proteína constitutiva β-actina usada para correção (Sense: 5' – ATGAAGATCCTGACCGAGCGTG – 3'; Antisense: 5' – CTTGCTGATCCACATCTGCTGG -3'; Tamanho: 512 pb; temperatura de anelamento: 54°C, número de ciclos: 24). Cada reação de amplificação foi realizada na presença de tampão de enzima 5X *Green or Colorless GoTaq Flexi Buffer* (Promega, USA), MgCl<sub>2</sub> (25mM), mistura de dNTPs (10 mM either), enzima *GoTaq DNA Polymerase* 5U/µL (Promega, USA), *primers* (sense and antisense, 10mM cada), 1µL de amostras do produto de RT e água destilada, conforme sugestão do fabricante (Promega, USA). As reações de PCR foram realizadas com um passo inicial de desnaturação do molde de cDNA a 95 °C por 2 min. Em seguida foram realizados ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento com temperaturas específicas para cada *primer* conforme já descrito e extensão de 72°C por 30s. Por fim, o material foi resfriado a 4°C até a realização da eletroforese em gel de agarose. As incubações foram realizadas em termociclador marca Techne, modelo ENDURANCE TC-312 (Techne Inc. New Jersey, EUA).

Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose-EtBr [0,5g de agarose, 50ml de tampão TAE 1X (TrisBase 0,4 M, Ác. Acético Glacial 0,2 M, EDTA 0,01 M, H<sub>2</sub>O deionizada), 1µl de brometo de

etídio]. O tempo de corrida do gel foi de aproximadamente 40 minutos, sob voltagem constante de 75mV e amperagem de 400mA, num sistema de eletroforese horizontal submarina, em “Running buffer” (TAE 1X).

As amostras no gel foram então visualizadas com iluminação UV. As imagens foram adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação (Mod. Gel Logic 100 c/ epi-iluminescência, Kodak Molecular Imaging, EUA), apropriado para este fim.

A expressão do RNA do gene do GLUT4 foi normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina, calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo.

### **3.10. Análise dos Dados**

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



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise do Peso

O peso corporal médio de desenvolvimento dos animais foi analisado durante as semanas do protocolo experimental. Pela curva de crescimento dos animais em estudo, verificou-se diferença estatística entre os grupos somente na sexta semana do protocolo.

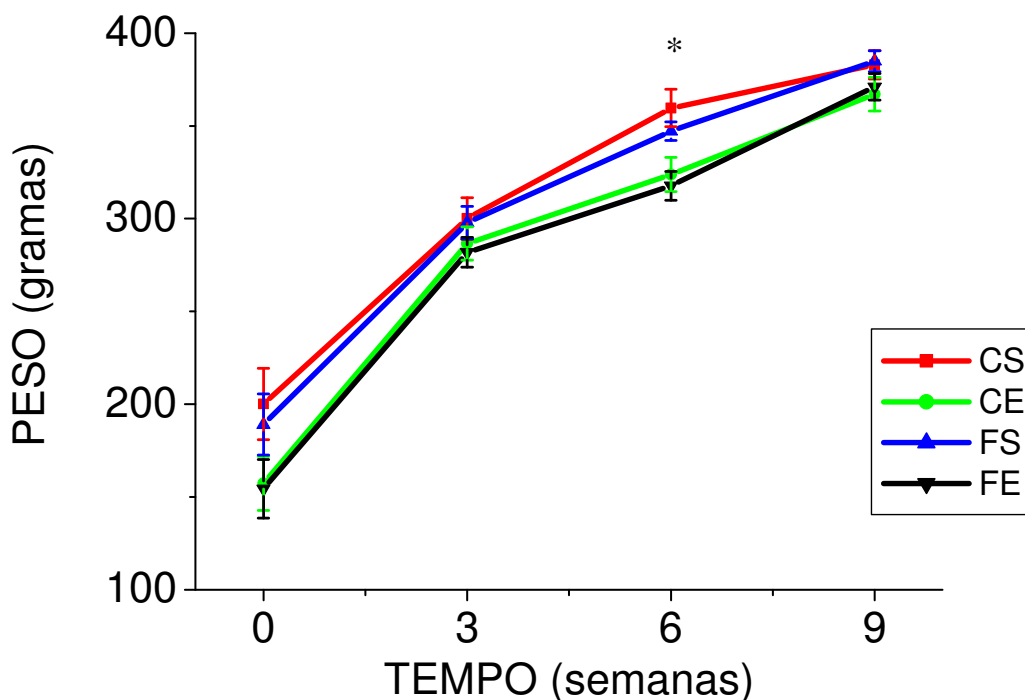


Fig. 07 – Curva de crescimento médio dos animais ao longo de 9 semanas. Os valores são apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), expressos em gramas (g). N=13 à 20 ratos. \* $P < 0,05$  em CE e FE vs. CS e  $P < 0,05$  em FS vs. FE. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE).

O peso corporal e o peso dos tecidos extraídos no dia do sacrifício dos animais estão descritos na Tabela 1. Comparando-se os grupos não se observam diferenças estatísticas, exceto no músculo sóleo, no qual houve aumento de peso tecidual significativo no grupo exercitado.

**Tabela 1 – Peso corporal e peso dos tecidos extraídos dos animais durante o sacrifício.**

Grupo	Peso Corporal	Peso Sóleo	Peso EDL	Peso Coração	Peso Tecido adiposo
CS	364,7 ±9,7	0,16±0,007	0,14±0,006	1,12±0,05	3,37±0,40
CE	372,4±7,2	0,20±0,008*	0,16±0,008	1,16±0,04	3,22±0,37
FS	368,9±6,7	0,18±0,005	0,15±0,005	1,14±0,05	3,92±0,31
FE	376,4±7,8	0,18± 0,005	0,15±0,008	1,19±0,05	2,85±0,21

Os valores são apresentados como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) expressos em gramas (g), n=18 à 22, \* $P < 0,05$  vs CS.

#### 4.2. Análise da Glicemia

A Fig. 08 mostra a glicemia de jejum (cerca de 12 horas) coletada no dia do sacrifício dos animais. Pela análise dos dados não se observam diferenças estatísticas entre os grupos (CS: 148,0±10 mg/dL, n=15; CE: 131,5±7,05 mg/dL, n=19; FS: 139,5±9,7 mg/dL, n=18; FE: 130,6 ±10,2 mg/dL, n=18).



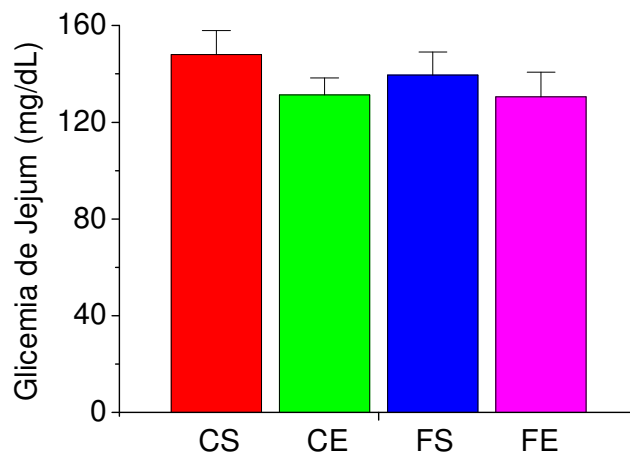
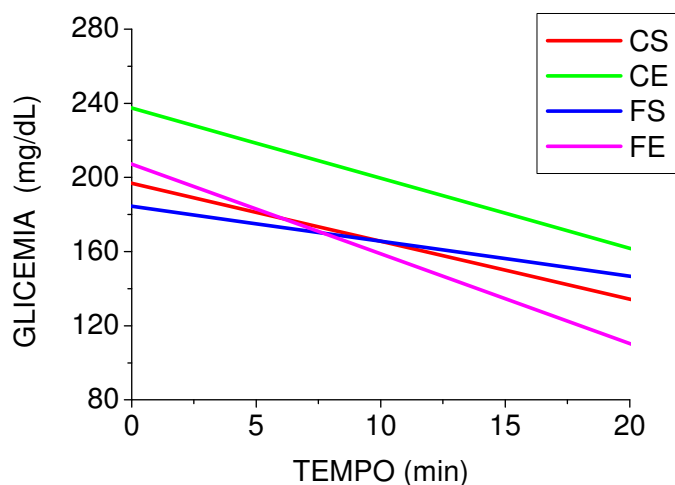


Fig. 08 – Glicemia de jejum dos animais no dia do sacrifício. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM, n=15 a 19. Não houve diferenças significativas.

#### 4.3. Análise da sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (kITT)

Pelo cálculo da constante de decaimento da glicose (kITT) foram encontradas diferenças significantes entre os grupos FS versus CS e FE (CS:  $3,7 \pm 0,3$ ; CE:  $5,28 \pm 0,5^*$ ; FS:  $2,1 \pm 0,7^*$ ; FE:  $4,8 \pm 0,09^\#$  %/min; n=3 à 6, \* $P < 0,05$  vs CS,  $^\# P < 0,05$  vs FS). Pode ser verificado que o grupo fumante apresentou quadro de resistência à insulina pela menor inclinação da curva glicêmica. Já o exercício físico moderado parece melhorar este índice visto que a inclinação da curva do grupo fumante exercitado foi mais acentuada (Fig. 09).

A)



B)

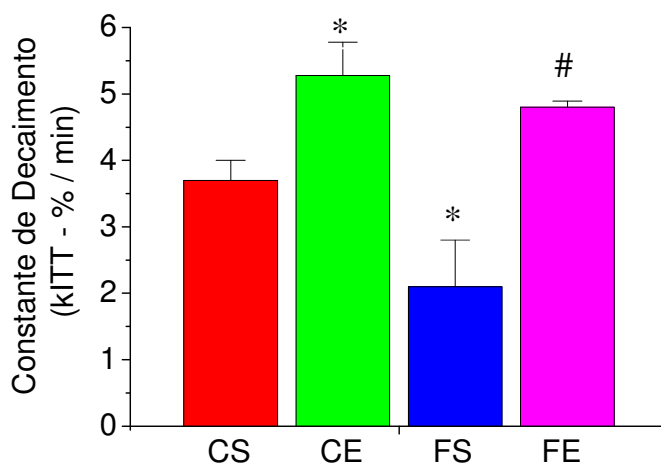


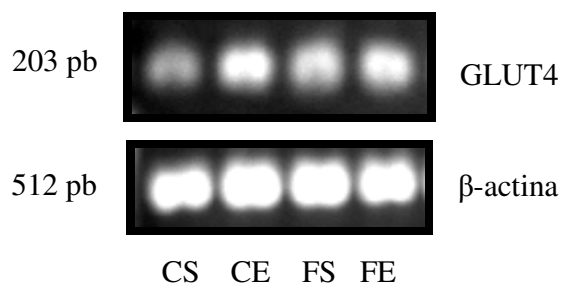
Fig. 09 – Teste de tolerância à insulina in vivo (ITT). A) Regressão linear da média dos valores de glicemia. B) Média  $\pm$  EPM da constante de decaimento da glicemia representando o desaparecimento da glicose no sangue após 20 minutos de teste. Os resultados foram obtidos com 3 à 6 ratos por grupo e os valores foram expressos em porcentagem por minutos (%/min). Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Valores significantes quando \* $P < 0,05$  vs CS; # $P < 0,05$  vs FS (ANOVA e Bonferroni como pós-teste).

#### 4.4. Análise da expressão do transportador de glicose GLUT4.

##### 4.4.1. Músculo oxidativo sóleo

Pelas análises de conteúdo de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo (Fig.10) verifica-se aumento significativo de 31% no grupo exercitado e aumento significativo de 28,5% no grupo fumante sedentário comparados ao grupo controle (CS:  $100 \pm 10,7$  UA; CE:  $130,9 \pm 7,7$  UA\*; FS:  $128,5 \pm 6,9$  UA\*; FE:  $121,5 \pm 7,7$  UA,  $n=10$ , \* $P<0,05$  vs CS).

A)



B)

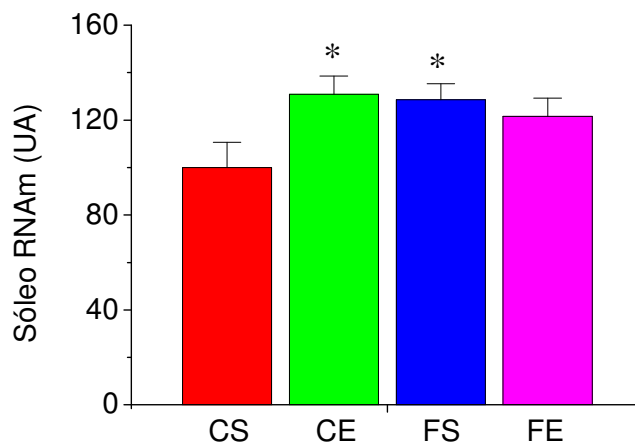


Fig. 10 – Análise da expressão de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo. 5 $\mu$ g de RNA total foram submetidas ao ensaio de RT-PCR conforme descrito em materiais e métodos. A) Imagens representativas dos produtos de RT-PCR do GLUT4 mRNA e da  $\beta$ -actina. B) Conteúdo de RNAm do GLUT4 corrigido pelo conteúdo de

RNAm de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) como média  $\pm$  EPM de 10 experimentos considerando CS como 100%. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). \* $P < 0,05$  vs CS (ANOVA e Bonferroni como pós-teste).

Na tabela 2 e na Fig. 11, podem ser vistos os valores médios  $\pm$  EPM das análises do conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana plasmática (MP).

Os dados foram apresentados como: unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g), conteúdo total de GLUT4 (UA), conteúdo total de GLUT4 por grama de peso tecidual (UA/g de tecido) e conteúdo de GLUT4 por grama de peso corpóreo (UA/g de peso corpóreo) conforme já descrito em materiais e métodos.

**Tabela 2 - Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana plasmática (MP) sob diferentes análises.**

<b>GRUPOS</b>	<b>Unidades Arbitrárias</b>	<b>Conteúdo Total</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Tecidual</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Corporal</b>
<b>CS</b>	106,71 $\pm$ 5,33	104,40 $\pm$ 8,46	101,61 $\pm$ 7,81	102,69 $\pm$ 7,24
<b>CE</b>	101,15 $\pm$ 10,47	130,76 $\pm$ 13,99	116,60 $\pm$ 12,21	133,28 $\pm$ 15,16
<b>FS</b>	67,66 $\pm$ 11,05*	65,41 $\pm$ 9,75*	66,37 $\pm$ 10,06*	71,71 $\pm$ 10,9*
<b>FE</b>	102,73 $\pm$ 7,95 <sup>#</sup>	123,02 $\pm$ 17,26 <sup>#</sup>	125,42 $\pm$ 19,63 <sup>#</sup>	127,67 $\pm$ 15,26 <sup>#</sup>

Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM. N= 10 animais por grupo em 10 diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM considerando CS como 100%. \* $P < 0,05$  vs CS; <sup>#</sup> $P < 0,05$  vs FS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Em todas as análises realizadas, observa-se redução de transportador na membrana plasmática (MP) no grupo FS comparado a CS e aumento significativo no grupo FE comparado a FS.

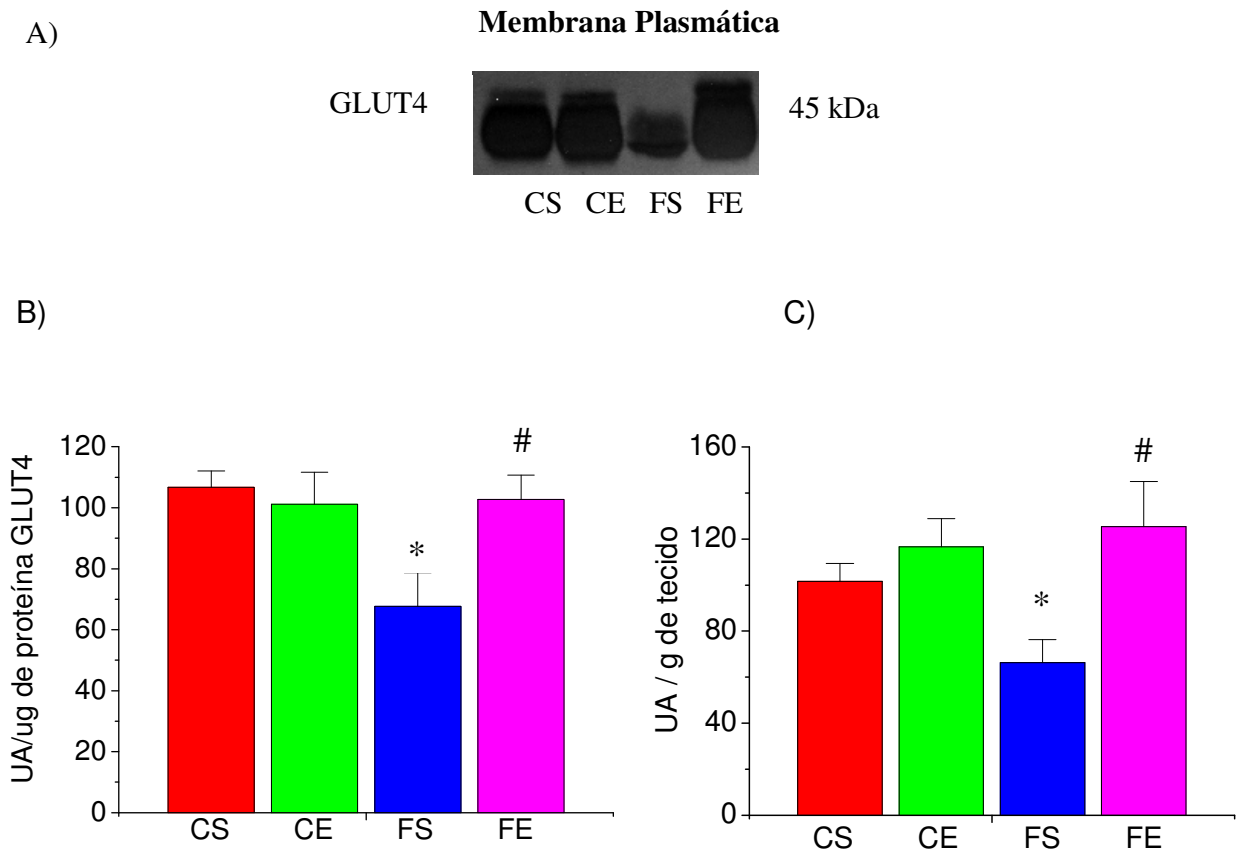


Fig. 11 - Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo, correspondente à fração de membrana plasmática (MP). Trinta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese e imunodeteção como descrito em Materiais e métodos. A) Típica autorradiografia obtida pelo ensaio de Western blotting. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g) como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo em 10 diferentes experimentos. C) Resultados expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g), como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo em diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). CS foi considerado como 100% para os cálculos. \* $P < 0,05$  vs CS; # $P < 0,05$  vs FS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Na tabela 3 e na Fig. 12 podem ser vistos os valores médios  $\pm$  EPM das análises do conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana microssomal de baixa densidade (M).

**Tabela 3 - Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo na fração de membrana microssomal de baixa densidade (M) sob diferentes análises.**

GRUPOS	Unidades Arbitrárias	Conteúdo Total	Conteúdo Total por Grama de Peso Tecidual	Conteúdo Total por Grama de Peso Corporal
CS	104,50 $\pm$ 23,98	103,31 $\pm$ 24,55	101,23 $\pm$ 25,14	103,28 $\pm$ 25,69
CE	155,48 $\pm$ 27,30	220,85 $\pm$ 50,72	199,54 $\pm$ 47,02	224,21 $\pm$ 52,54
FS	124,36 $\pm$ 22,26	141,15 $\pm$ 39,82	136,25 $\pm$ 38,07	147,96 $\pm$ 40,59
FE	184,19 $\pm$ 34,91*	206,23 $\pm$ 59,64	214,83 $\pm$ 66,60	214,95 $\pm$ 62,57

Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM. N=10 animais/grupo em 10 diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $P$ <0,05 vs CS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Em todas as análises, verificou-se uma forte tendência a uma elevação no conteúdo de GLUT4 nos animais exercitados, fumantes ou não, na fração microssomal. Já o tabagismo aumentou discretamente o conteúdo de GLUT4 comparado ao controle sedentário.

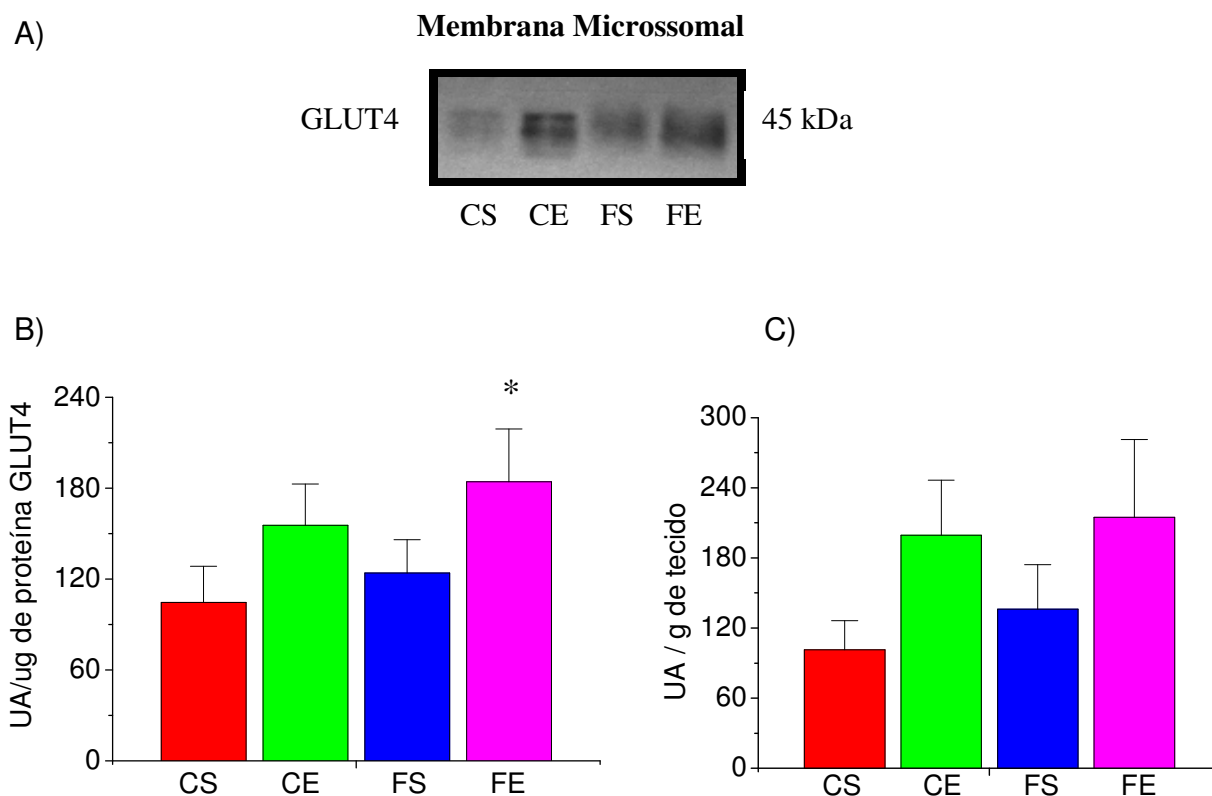


Fig. 12 - Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo sóleo, correspondente à fração de membrana microssomal (M). Vinte microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese e imunodeteção como descrito em Materiais e métodos. A) Típica autorradiografia obtida pelo ensaio de Western blotting. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g) como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo em 10 diferentes experimentos. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g). como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo em diferentes experimentos. C) Resultados expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g), como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). \* $P < 0,05$  vs CS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Somando-se as quantidades totais de GLUT4 da fração MP e da fração M, tem-se o conteúdo de transportador que realmente realiza captação de glicose no tecido, sendo o conteúdo da MP o conteúdo pronto para transportar glicose e o conteúdo da M o transportador capaz de se translocar para a MP e captar glicose efetivamente. Assim, constatou-se que o exercício favorece aumento do conteúdo protéico de GLUT4 no músculo oxidativo (CS:  $207,7 \pm 21,1$  UA; CE:  $351,6 \pm 52,6^*$  UA; FS:  $206,5 \pm 43,4$  UA; FE:  $329,2 \pm 71,6$  UA,  $*P < 0,05$  vs CS,  $n=10$ ), pois houve aumento tanto no grupo CE como no grupo FE comparados ao CS e FS, respectivamente, e observou-se que o tabagismo não alterou a quantidade transportador de glicose GLUT4 capaz de captar glicose no músculo oxidativo (Fig. 13).

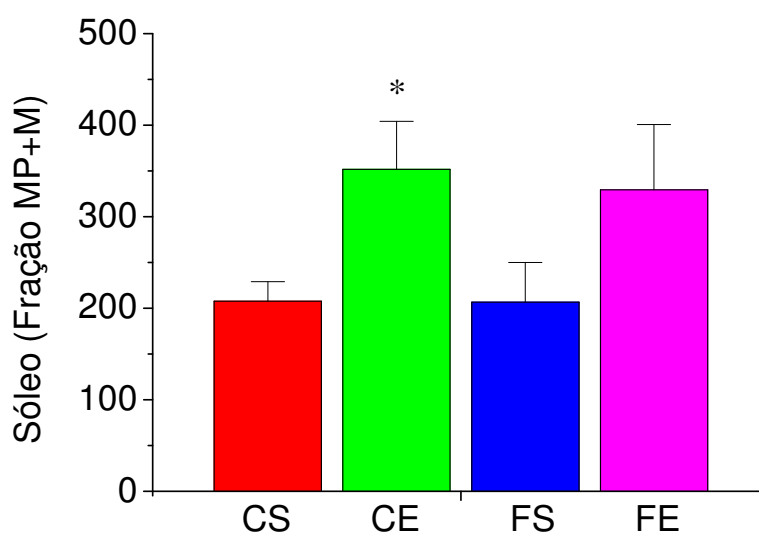


Fig. 13 - Somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática (MP) e de microssoma (M) de baixa densidade do tecido solear. Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA), como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE).  $*P < 0,05$  vs CS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.



Calculando-se o conteúdo de GLUT4 que translocou no momento da retirada do tecido, não se verificou diferenças significativas entre os grupos (CS:57,1±8,6 UA; CE:43,2±6,8 UA; FS:44,5±8,5 UA; FE:49,4±7,8 UA, n=10). Entretanto se evidencia uma diminuição de 21% no grupo FS comparado a CS, sugerindo que provavelmente o tabagismo poderia atrapalhar o evento da translocação (Fig. 14).

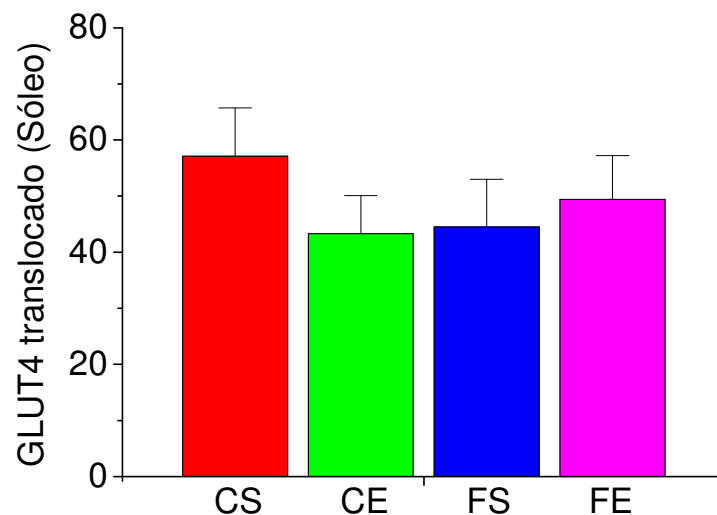
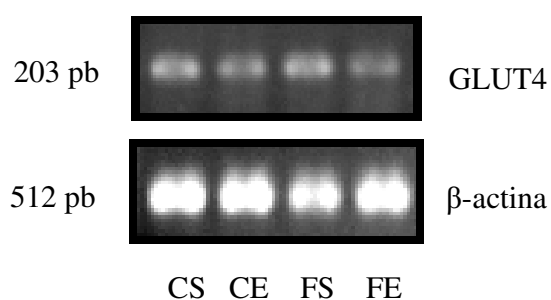


Fig. 14 – Quantidade de GLUT4 translocado no momento de retirada do tecido muscular oxidativo sóleo. Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA), como média ± erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

#### 4.4.2. Músculo glicolítico EDL

O conteúdo de RNAm do GLUT4 no músculo glicolítico EDL (Fig. 15) não está alterado nem com o tabagismo, nem com a prática de exercício físico (CS:  $100 \pm 11,2$  UA; CE:  $102,7 \pm 9,8$  UA; FS:  $103,7 \pm 10,3$  UA; FE:  $104,2 \pm 11,6$  UA, n= 11).

A)



B)

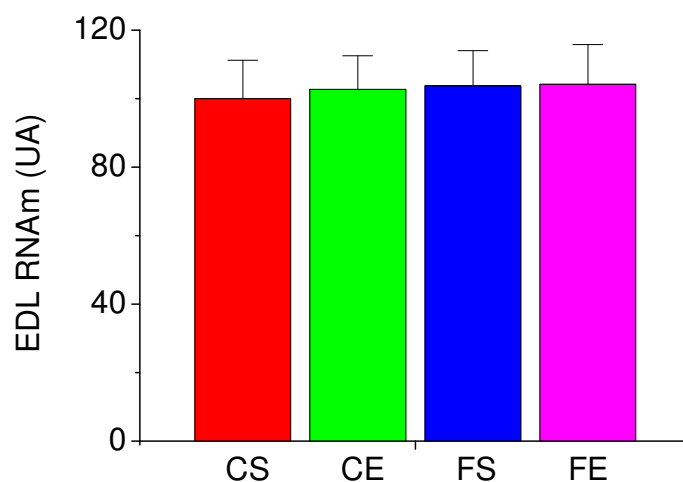


Fig. 15 – Conteúdo de RNAm do GLUT4 no músculo EDL. A) imagens representativas dos produtos de RT-PCR de GLUT4 mRNA e respectivas  $\beta$ -actina. B) expressão de RNAm do GLUT4 corrigido pelo RNAm de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) como média  $\pm$  EPM de 11 animais por grupo em 11 experimentos diferentes. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE).

A tabela 4 exibe os valores médios  $\pm$  EPM das análises do conteúdo de protéico de transportador no músculo EDL na fração de membrana plasmática (MP). Os dados foram apresentados como: unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g), conteúdo total de GLUT4 (UA), conteúdo total de GLUT4 por grama de peso tecidual (UA/g de tecido) e conteúdo de GLUT4 por grama de peso corpóreo (UA/g de peso corporal).

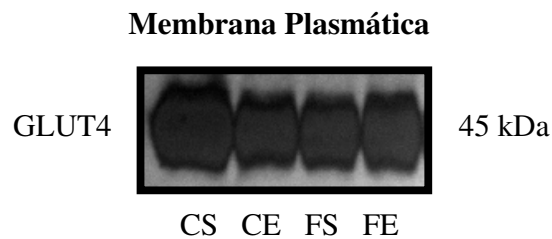
**Tabela 4 - Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo EDL na fração de membrana plasmática (MP) sob diferentes análises.**

<b>GRUPOS</b>	<b>Unidades Arbitrárias</b>	<b>Conteúdo Total</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Tecidual</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Corporal</b>
<b>CS</b>	106,75 $\pm$ 9,59	111,73 $\pm$ 18,04	112,16 $\pm$ 20,04	102,67 $\pm$ 16,81
<b>CE</b>	93,31 $\pm$ 6,44	93,28 $\pm$ 7,69	85,25 $\pm$ 8,30	92,00 $\pm$ 10,74
<b>FS</b>	85,88 $\pm$ 5,82*	72,70 $\pm$ 6,09*	66,53 $\pm$ 4,93*	76,8 $\pm$ 5,23
<b>FE</b>	83,40 $\pm$ 5,62*	81,60 $\pm$ 8,56	75,85 $\pm$ 8,13*	88,05 $\pm$ 8,87

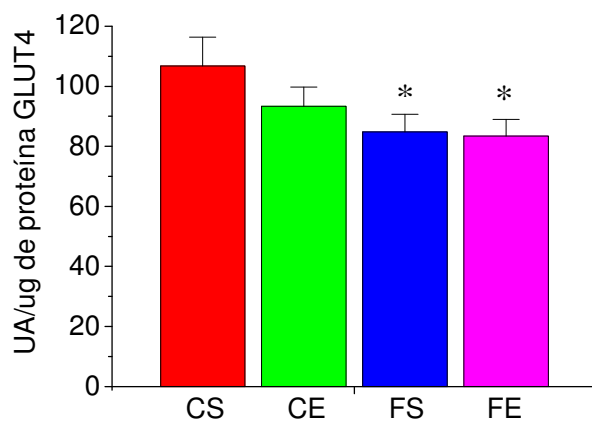
Os valores são apresentados como Média  $\pm$  EPM. N= 9 a 10 animais por grupo em diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $P$ <0,05 vs CS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Observou-se que houve diminuição significativa de GLUT4 quando expresso por UA/g de tecido na membrana plasmática com o tabagismo, o que não foi revertido com a prática de exercício físico (Fig. 16).

A)



B)



C)

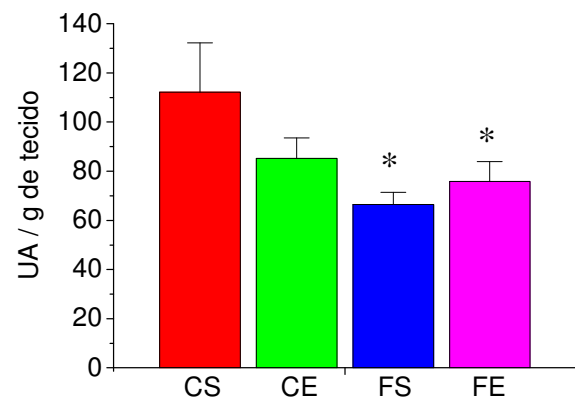


Fig. 16 - Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo EDL, correspondente à fração de membrana plasmática (MP). Trinta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese e imunodeteção como descrito em Materiais e métodos. A) Típica autorradiografia obtida pelo ensaio de Western blotting. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/μg), como média ± erro padrão da média (EPM) de 9 à 10 animais por grupo em diferentes experimentos. Resultados expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g), como média ± EPM de 9 à 10 animais por grupo em experimentos diferentes. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). \* $P < 0,05$  vs CS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

A tabela 5 exibe os valores médios  $\pm$  EPM das análises do conteúdo de protéico de transportador no músculo EDL na fração de membrana microssomal (M). Não se observam diferenças significantes entre os grupos, porém o grupo CE apresentou valores maiores que o grupo CS em todas as análises, o que não se observa nos indivíduos fumantes.

**Tabela 5 - Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo EDL na fração de membrana microssomal de baixa densidade (M) sob diferentes análises.**

GRUPOS	Unidades Arbitrárias	Conteúdo Total	Conteúdo Total por Grama de Peso Tecidual	Conteúdo Total por Grama de Peso Corporal
CS	107,53 $\pm$ 13,86	106,86 $\pm$ 54,75	106,72 $\pm$ 17,98	105,62 $\pm$ 15,93
CE	127,00 $\pm$ 19,55	162,92 $\pm$ 83,15	154,73 $\pm$ 28,16	172,11 $\pm$ 30,31
FS	106,49 $\pm$ 18,53	133,85 $\pm$ 62,60	122,19 $\pm$ 15,22	142,79 $\pm$ 20,98
FE	118,99 $\pm$ 28,41	122,15 $\pm$ 99,19	110,90 $\pm$ 28,72	130,71 $\pm$ 32,23

Os valores são apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM; n= 9 a 10 animais por grupo em diferentes experimentos.

Avaliando o conteúdo de transportador na membrana microssomal (M) do músculo EDL, pelas análises de conteúdo total de GLUT4 por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g) e por grama de tecido (UA/g tecido), não se encontrou diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Porém pela análise em UA/g tecido nota-se um aumento de 44,9% do conteúdo protéico de GLUT4 no grupo CE (Fig 17).

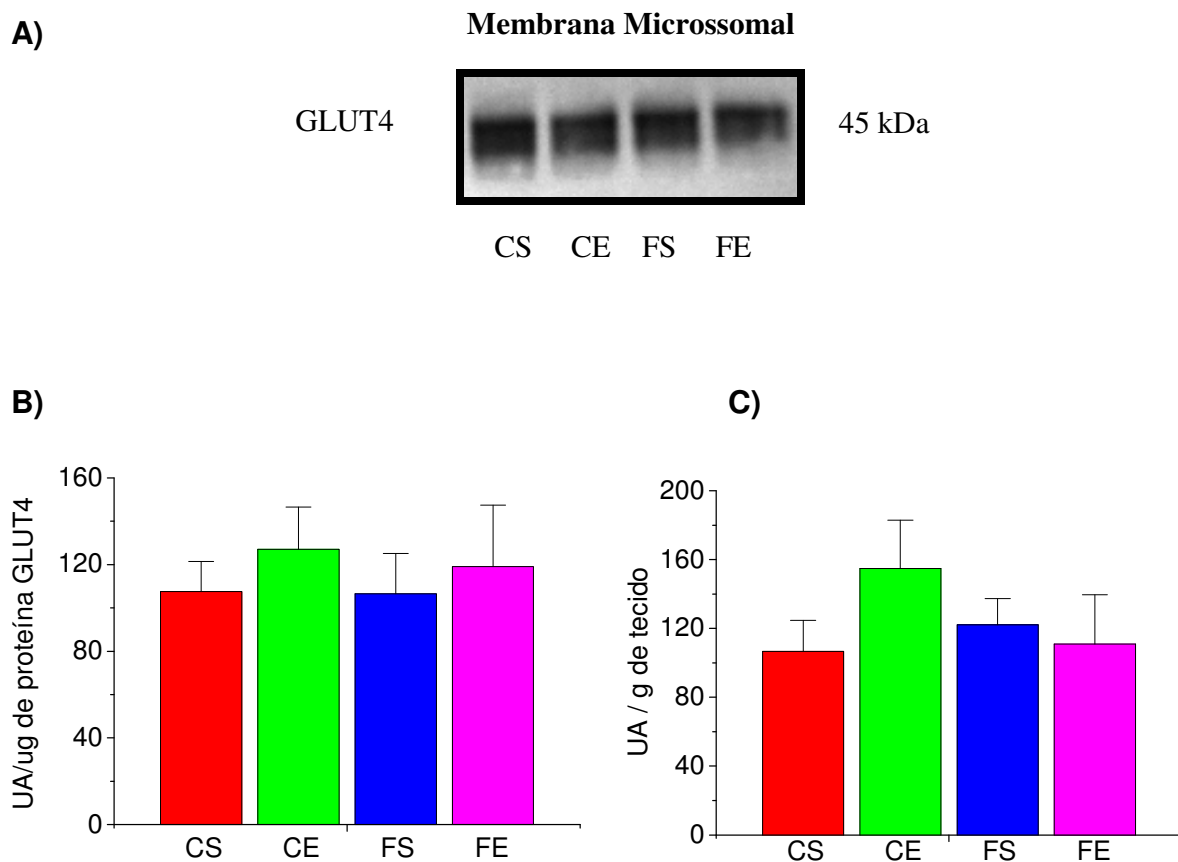


Fig. 17 - Conteúdo protéico de GLUT4 no músculo EDL, correspondente à fração de membrana microsomal (M). Vinte microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese e imunodeteção como descrito em Materiais e métodos. A) Típica autorradiografia obtida pelo ensaio de Western blotting. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g), como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 9 a 10 animais por grupo em diferentes experimentos. C) Resultados expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g), como média  $\pm$  EPM de 9 a 10 animais por grupo em diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). CS foi considerado como 100% para os cálculos. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Pela somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática (MP) e de microssoma (M) de baixa densidade do músculo EDL (Fig. 18), não se verificou diferença estatística significativa entre os grupos, mas nota-se discreto aumento de 17% no grupo CE (CS:  $218,6 \pm 31,4$  UA; CE:  $256,2 \pm 33,6$  UA; FS:  $206,6 \pm 21,3$  UA; FE:  $203,7 \pm 35,5$  UA, n= 9 a 10).

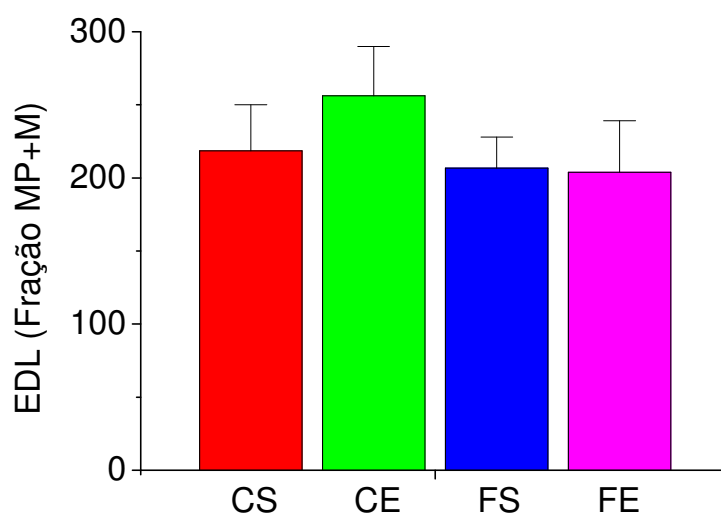


Fig. 18 - Somatória das quantidades totais de GLUT4 presente nas frações de membrana plasmática (MP) e de microssoma (M) de baixa densidade do músculo EDL. Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA), como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 9 a 10 animais por grupo em diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

A quantidade de transportador de glicose GLUT4 translocado para a membrana plasmática no momento da retirada do tecido não estava alterada entre os grupos (CS:51,2±3,8 UA; CE:39,1±3,7 UA; FS:38,5±4,6 UA; FE:53,7±8,9 UA). Porém, dentre os quatro grupos o FS foi o que apresentou menor valor, tendo uma diminuição de 24% comparado ao CS e 29% comparado ao FE (Fig. 19).

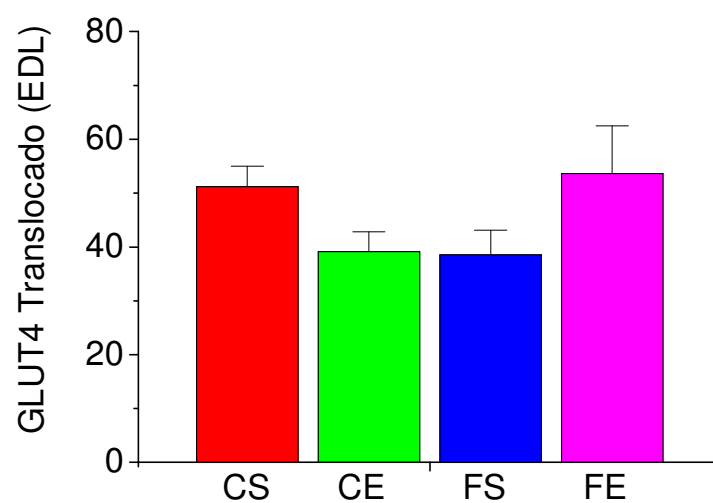


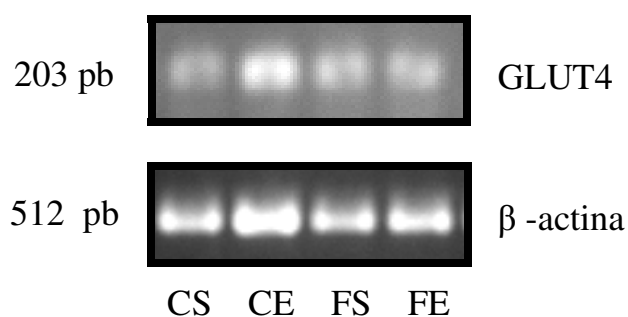
Fig. 19 - Índice de translocação da proteína transportadora GLUT4 para a membrana plasmática no músculo EDL. Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA), como média ± erro padrão da média (EPM) de 9 a 10 animais por grupo. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.



#### 4.4.3. Músculo Cardíaco

Pela análise da expressão de RNAm do GLUT4 nas amostras de músculo cardíaco (Fig. 20) não verificamos diferenças estatísticas entres os grupos estudados (CS:75,7±9,7; CE:82,12±8,5; FS:75,9±7,08; FE:76,73±7,8 UA, n=10).

A)



B)

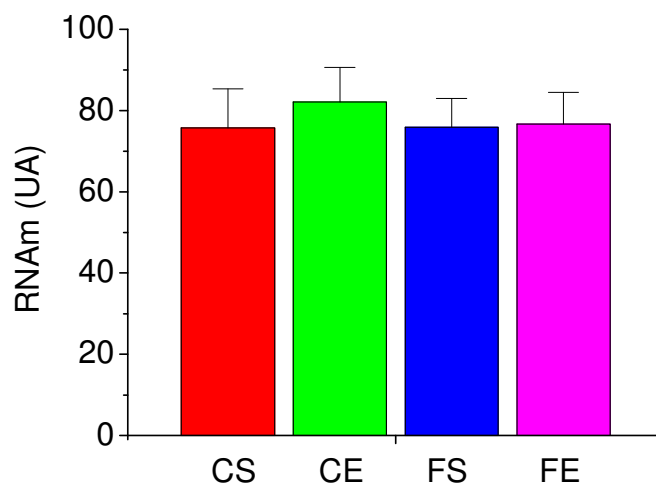


Fig. 20 – Análise da expressão de RNAm do GLUT4 no tecido cardíaco. 5µg de RNA total foram submetidas ao ensaio de RT-PCR conforme descrito em materiais e métodos. A) Imagens típicas de GLUT4 mRNA e respectivas β-actina obtidas por RT-PCR; B) Expressão de RNAm do GLUT4 corrigido pelo RNAm de β-actina. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) como média ± EPM de 10 animais por grupo em 10 diferentes experimentos.

Na tabela 6 estão expressos os valores médios  $\pm$  EPM das análises do conteúdo protéico de GLUT4 no músculo cardíaco na fração de membrana plasmática (MT). Os dados foram apresentados como: unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ $\mu$ g), conteúdo total de GLUT4 (UA), conteúdo total de GLUT4 por grama de peso tecidual (UA/g de tecido) e conteúdo de GLUT4 por grama de peso corpóreo (UA/g de peso corporal).

**Tabela 6 - Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo cardíaco na fração de membrana total (MT) sob diferentes análises.**

<b>GRUPOS</b>	<b>Unidades Arbitrárias</b>	<b>Conteúdo Total</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Tecidual</b>	<b>Conteúdo Total por Grama de Peso Corporal</b>
<b>CS</b>	100,99 $\pm$ 6,20	119,45 $\pm$ 8,53	119,72 $\pm$ 9,98	118,90 $\pm$ 8,74
<b>CE</b>	109,23 $\pm$ 4,79	140,77 $\pm$ 9,94	143,09 $\pm$ 9,09	140,68 $\pm$ 8,88
<b>FS</b>	95,97 $\pm$ 7,32	88,62 $\pm$ 10,64*	84,36 $\pm$ 10,99*	90,33 $\pm$ 9,84*
<b>FE</b>	107,91 $\pm$ 6,43	131,00 $\pm$ 8,74 <sup>#</sup>	132,18 $\pm$ 11,40 <sup>#</sup>	137,50 $\pm$ 10,93 <sup>#</sup>

Os valores são apresentados como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM; n= 10 a 11 animais por grupo em diferentes experimentos. CS foi considerado como 100% para os cálculos. \* $P$ <0,05 vs CS; <sup>#</sup> $P$ <0,05 vs FS. ANOVA e Bonferroni como pós-teste.

Verificou-se uma importante redução no conteúdo total de GLUT4 no grupo FS, bem como por grama de tecido e por grama de peso corporal, evidenciando uma piora na expressão de GLUT4 no músculo cardíaco devido ao tabagismo. Este quadro foi completamente revertido com a prática de exercício físico (Fig. 21).

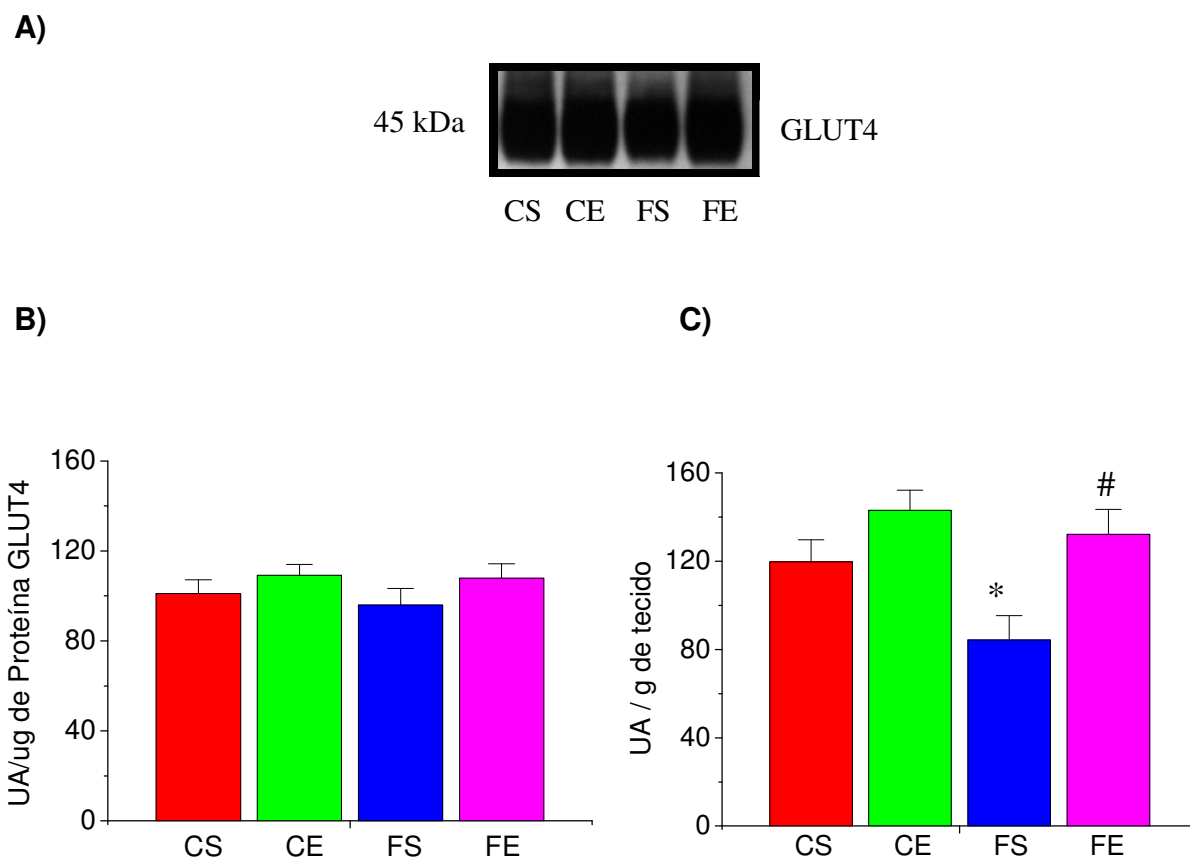


Fig. 21 – Conteúdo de proteína GLUT4 no músculo cardíaco na fração de membrana total (MT). Trinta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese e imunodeteção como descrito em Materiais e métodos. A) Típica autorradiografia obtida pelo ensaio de Western blotting. B) Resultados expressos em unidades arbitrárias por micrograma de proteína (UA/ug), como média e erro padrão da média (EPM),  $n=10$  à 11 ratos por grupo em diferentes experimentos. C) Resultados expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g), como média  $\pm$  EPM,  $n=10$  à 11 ratos por grupo em diferentes experimentos. Grupo controle (CS), controle exercitado (CE), fumante sedentário (FS) e fumante exercitado (FE). \* $P<0,05$  vs CS, # $P<0,05$  vs FS (ANOVA e Bonferroni como pós-teste).



## 5. DISCUSSÃO

O tabagismo é hoje um dos principais problemas de saúde pública. É notória a participação do tabaco no aumento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares, pulmonares, circulatórias e numerosos tipos de câncer, contribuindo para o incremento da morbidade e mortalidade populacional <sup>(5)</sup>.

Sabe-se que o tabagismo altera o metabolismo celular em vários aspectos e a literatura atual indica que o fumo está associado a um quadro de resistência à insulina e de diminuição da tolerância à glicose<sup>(26)</sup>, o que em longo prazo pode culminar em desenvolvimento de um quadro de Diabetes tipo 2 (DM2)<sup>(93)</sup>. Contudo, a literatura atual também apresenta que o exercício físico regular tem sido recomendado para a prevenção e tratamento da Resistência à insulina e Diabetes tipo 2, uma vez que pode melhorar a capacidade de transporte de glicose pelo músculo independente da ação insulínica, e até mesmo aumentar a ação da insulina<sup>(58)</sup>.

Pesquisas com animais têm sido realizadas no estudo da ação do fumo sobre as variáveis comportamentais, como apetite, fome, ganho de peso, consumo alimentar, variáveis cardíacas, entre outras<sup>(11,84,94)</sup>. No entanto a associação entre tabagismo passivo e expressão de GLUT4 ainda é pouco investigada.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tabagismo e de atividade física moderada associada sobre a sensibilidade à insulina em músculos esqueléticos oxidativo (sóleo) e glicolítico (EDL) e em músculo cardíaco de ratos, através da quantificação de proteína e de RNAm do transportador de glicose GLUT4.

Existem alguns mecanismos causais que poderiam explicar o efeito do fumo sobre a alteração no metabolismo glicídico. Um destes mecanismos é a ativação do sistema nervoso simpático com a liberação de catecolaminas que são reconhecidas por diminuir a sensibilidade insulínica e reduzir a captação de glicose insulino-mediada via receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>(95)</sup>. Uma hiperatividade

simpática crônica pode participar na patogênese e complicações da síndrome metabólica incluindo aumento da pressão arterial, aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, resistência insulínica e doenças cardiovasculares. Os possíveis fatores que aumentam a ativação simpática incluem as alterações nos níveis de insulina circulantes, níveis de leptina, ácidos graxos não esterificados, citocinas, eicosanóides, óxido nítrico, endorfinas, entre outros,<sup>(96, 97,98)</sup> e o fumo parece aumentar a liberação de várias dessas substâncias. Em relação à proteína GLUT4, e a respeito da atividade simpática, estudos *in vitro* mostraram que o AMP cíclico, o segundo mensageiro dos efeitos  $\beta$ -adrenérgicos, reprime a transcrição do gene do GLUT4 em adipócitos<sup>(99)</sup>. O estudo de MULDER e colaboradores<sup>(100)</sup> mostrou também que a estimulação adrenérgica inibe a captação de glicose em adipócitos (3T3-L1), interferindo na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática.

Um segundo mecanismo candidato é a alteração na função hipotalâmica-pituitária-adrenal com ampla liberação de cortisol. O cortisol, por sua vez, aumenta a gliconeogênese hepática e inibe a secreção de insulina pelas células B pancreáticas<sup>(54)</sup>. O tratamento com cortisol por mais de 24 horas é conhecido como indutor de resistência insulínica periférica devido à diminuição na atividade da enzima glicogênio sintase no músculo esquelético<sup>(50)</sup>, e já foi demonstrado que corticosteróides prejudicam a translocação de GLUT4 insulino-estimulada<sup>(101)</sup>.

Como um terceiro mecanismo, pode-se dizer que o fumo provoca inflamação das vias aéreas e inflamação sistêmica de baixo grau<sup>(34)</sup> pela ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, que liberam proteases e espécies reativas de oxigênio (EROS) podendo suprimir a secreção insulínica e piorar a sensibilidade ao hormônio. O aumento do estresse oxidativo leva a ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis como o fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), que são críticos para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>(36,102)</sup>. Estudos recentes mostraram que o TNF- $\alpha$  tem importante papel como mediador da resistência insulínica e na patogênese do diabetes tipo 2. Na transdução do sinal insulínico, o TNF- $\alpha$  age bloqueando a ação da insulina através da inibição da atividade tirosina-quinase da subunidade beta e

da fosforilação do receptor de insulina (IRS-1). Quanto ao GLUT4, isoforma transportadora de glicose insulino-responsiva, TNF- $\alpha$  age regulando de forma negativa o RNAm do GLUT4 em adipócitos e miócitos<sup>(103)</sup>. Além disso, o próprio NF-kB tem efeito negativo sobre a expressão do GLUT4, diminuindo sua transcrição<sup>(73)</sup>.

Na literatura, evidencia-se que a nicotina presente no tabaco, agudamente aumenta o gasto energético e pode reduzir o apetite, o que provavelmente explica porque fumantes tendem a ter menor peso corpóreo do que não-fumantes. A inalação de nicotina através da fumaça do cigarro promove a elevação aguda da concentração de alguns neurotransmissores, como dopamina e serotonina, substâncias inibidoras da ingestão de alimentos. O fumo também aumenta atividade adrenérgica a qual pode diretamente aumentar a termogênese e reduzir o peso<sup>(104)</sup>. Verifica-se também que pessoas que deixam de fumar costumam ganhar peso, uma vez que, aumentam o consumo calórico, e alteram o metabolismo tecidual. Na fase de cessação, há o consumo preferencial de alimentos especialmente ricos em gorduras e açúcares. Além deste aumento na ingestão lipídica durante este processo, outros mecanismos estão em estudo, como as alterações na lipase lipoproteica<sup>(105)</sup>.

Contrariamente a estes achados da literatura, o peso dos animais do presente estudo não variou com o tabagismo (Tabela 01). Uma hipótese que poderia justificar este resultado seria o tempo (60 dias) de exposição ao cigarro ao que os animais foram submetidos no estudo, o qual pode não ter sido o suficiente para afetar a ingestão alimentar e causar redução na incorporação de massa nos animais estudados. Na literatura, GONÇALVES-SILVA e colaboradores<sup>(94)</sup> verificaram que o peso e o consumo alimentar de ratos machos expostos à fumaça de cigarro na dose 2 cigarros/animal/dia, durante 15 minutos, 2x/dia, por 30 dias foram inferiores aos dos não-expostos, sugerindo que realmente a dose de cigarro por dia parece ser o fator mais importante para verificar alterações nestes parâmetros.

Há cada vez mais indícios de que o tabagismo crônico é propício para contribuir com maior acúmulo de gordura abdominal visceral (aumento da relação

cintura-quadril), e maior probabilidade de desenvolver um quadro de resistência à insulina e diabetes tipo 2<sup>(28, 106)</sup>. O fumo também promove aumento de lipólise por provável ativação simpática e peroxidação lipídica<sup>(107)</sup>, favorecendo a liberação de ácidos graxos livres (AGL) na corrente sanguínea. Sabe-se que o aumento de AGL desempenha papel importante na patogênese do diabetes e pode estar envolvido nos eventos precoces que levam à resistência insulínica em humanos<sup>(29)</sup>. Entretanto, no presente estudo não foi detectada alteração na distribuição da massa adiposa na região visceral, uma vez que o peso do tecido adiposo periepididimal dos animais não variou entre os grupos. Mais uma vez, acreditamos que a dose e tempo de exposição podem não ter influenciado o ganho/distribuição de massa adiposa.

Como já mencionado anteriormente, um crescente corpo de evidências indica que o tabagismo, tanto ativo quanto passivo, está associado com um quadro de resistência à insulina, diminuição da tolerância à glicose e, em longo prazo, Diabetes tipo 2<sup>(27, 28, 108)</sup>.

No presente estudo, observou-se que o tabagismo não alterou a glicemia de jejum dos animais, embora a literatura aponte aumento nos níveis séricos de glicose em fumantes<sup>(109, 110)</sup>, provavelmente por competição como fonte energética pelos ácidos graxos livres circulantes que aumentam em fumantes<sup>(107)</sup>. Contudo, trabalhos envolvendo tabagismo tanto com humanos ou animais, apresentam uma série de vieses tais como número de cigarros usados por dia, número de tragadas, tempo de exposição, etc. Assim, o presente protocolo de fumo passivo, em que 4 cigarros foram utilizados na exposição de 10 animais, 2 vezes ao dia, durante 60 dias, pode não ter sido suficiente para alterar os níveis de glicose dos animais sob investigação.

Em 2009, VANCEA e colaboradores<sup>(111)</sup> demonstraram em seu trabalho que sessões de atividade física, 5x/semana, durante 20 semanas reduziu a glicemia de jejum de indivíduos diabéticos do tipo 2. No presente trabalho, embora o exercício físico não tenha alterado a glicemia de jejum, em ambos os modelos, controle e fumante (CE e FE), o exercício parece ter reduzido discretamente este valor (Fig.



08), salientando a importância da prática de atividade física para a melhora da sensibilidade insulínica<sup>(112)</sup>.

Neste trabalho, foi realizada uma avaliação da sensibilidade à insulina “*in vivo*” através de teste de tolerância à insulina (ITT) (Fig. 09). O teste consistiu na administração de insulina regular, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose ao longo de 20 minutos. Esta queda da glicose é determinada por dois fatores: supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, músculos (esquelético, cardíaco e liso) e tecido adiposo.

A interpretação do ITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a inclinação da curva glicêmica, mais sensível o indivíduo será à insulina. Quanto maior a constante de decaimento da glicose (kITT), maior a sensibilidade à insulina<sup>(113)</sup>.

Assim, avaliando-se os resultados obtidos pelo cálculo do kITT, observou-se que o fumo causou uma importante redução na sensibilidade à insulina, uma vez que houve menor inclinação na curva glicêmica do grupo fumante não-exercitado, cujo coeficiente angular foi 43% menor que o controle. Estudos clínicos utilizando o clamp euglicêmico e hiperinsulinêmico também têm sugerido que fumantes exibem reduzida sensibilidade à insulina comparados a não-fumantes, e que a cessação tabágica aumenta a sensibilidade insulínica e melhora o perfil lipoprotéico<sup>(29)</sup>. Tem sido especulado que a diminuída sensibilidade à insulina entre fumantes pode ser devido a efeitos diretos da nicotina, monóxido de carbono ou outros agentes do tabaco. Alternativamente, o tabagismo prolongado pode levar a alterações vasculares que reduzem o fluxo sanguíneo aos músculos esqueléticos, e, portanto, provocar uma diminuição da captação da glicose insulino-mediada<sup>(114)</sup>.

No entanto, a atividade física aparece como um dos fatores que poderia modificar o risco dos indivíduos desenvolverem resistência insulínica e/ou diabetes. Numerosos fatores metabólicos e hemodinâmicos podem contribuir para a melhora na homeostasia glicídica proporcionada pelo exercício. Dentre eles podemos mencionar a melhora na ação insulínica, especialmente no músculo

esquelético, estimulação hormonal reduzida da produção de glicose hepática, aumento na atividade da glicogênio-sintetase, aumento da densidade capilar e melhora do fluxo sanguíneo no músculo, normalização do perfil lipídico sanguíneo, aumento na atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas, aumento das fibras musculares mais sensíveis à ação insulínica e aumento da expressão e translocação de GLUT4 para a membrana plasmática<sup>(59,60)</sup>. Nosso estudo então corrobora com os achados na literatura em que o exercício físico determina melhora na ação insulínica<sup>(59)</sup>, visto que o grupo fumante exercitado apresentou um coeficiente angular maior que o fumante sedentário cerca de 128%, ou seja, melhor resposta à insulina. Além disso, mesmo no grupo não-fumante, porém exercitado, observou-se uma inclinação mais acentuada, evidenciando o efeito benéfico da prática regular de exercício físico sobre a sensibilidade à insulina.

Verifica-se na literatura que tanto o tabagismo quanto o exercício tem sido relacionados à hipóxia tecidual transitória. Parece que existem evidências em favor de prejuízo e de melhora da ação insulínica em resposta à hipóxia. Alguns estudos demonstraram que o estímulo hipóxico e o sinal insulínico são aditivos em seu efeito de aumentar o transporte de glicose no músculo<sup>(115, 116)</sup>. No entanto, outros estudos mostram que a captação de glicose insulino-mediada não pode necessariamente ser reforçada por hipóxia intermitente, uma vez que ela estimula aumento de níveis de hormônios contrarreguladores circulantes, tais como cortisol, e causa ativação do sistema nervoso simpático com liberação de adrenalina. Estas substâncias, por sua vez, podem neutralizar a ação da insulina, reduzindo a sensibilidade ao hormônio, alterando o metabolismo da glicose<sup>(52, 53,54)</sup>.

Na presente investigação, pelas análises de conteúdo de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo, verificou-se aumento significativo de 28,5% no grupo fumante sedentário e aumento semelhante de 21,5%, no grupo fumante exercitado comparado ao controle. Inesperadamente, isso reflete que o tabagismo pode estar regulando de maneira positiva a transcrição do GLUT4 na musculatura oxidativa. Uma possível explicação para isso seriam as características deste tipo de fibra muscular. As fibras vermelhas (sóleo) são ricas em mitocôndrias e possuem grande capacidade oxidativa, e, desta forma, podem ter grande sensibilidade à

hipóxia causada pelo fumo. A literatura mostra que estímulos que causam a redução na tensão de oxigênio ( $O_2$ ) causam aumento da transcrição de GLUT4, uma vez que ativa o fator de transcrição induzido por hipóxia 1-a (HIF1-a)<sup>(73)</sup>, um importante fator transcricional regulador da expressão do gene do GLUT4 no músculo. Ainda pelas análises de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo (oxidativo), verificou-se aumento significativo de 31% no grupo CE comparado a CS, corroborando com os achados da literatura que aponta que o exercício físico é um importante estímulo fisiológico para aumentar a expressão de RNAm do GLUT4<sup>(117)</sup>. Neste estudo não foram analisados fatores de transcrição do gene do GLUT4, mas acredita-se que o conteúdo de RNAm do transportador de glicose esteja aumentado no grupo exercitado em virtude do aumento de expressão de alguns fatores transcricionais pela própria contração muscular, tais como, MEF2A, MEF2D e HIF1-a<sup>(63,73,74)</sup>.

Analisando os resultados de conteúdo de proteína GLUT4 por grama de tecido na fração celular de membrana plasmática (MP), observou-se que o tabagismo causou significativa redução de 35% no conteúdo de transportador do músculo oxidativo solear (Fig. 11), com manutenção na membrana microssomal (M) comparado ao grupo CS, não-fumante (Fig. 12), sugerindo que o tabagismo passivo poderia estar prejudicando a translocação do GLUT4 da fração microssomal para a fração de membrana plasmática no modelo utilizado.

De fato, a literatura tem mostrado que o tabagismo gera inflamação sistêmica e estresse oxidativo<sup>(107, 118)</sup> que, por sua vez, prejudica a translocação de GLUT4 insulino-estimulada, potencialmente pela interferência na ativação da fosfatidilinositol 3 – cinase (PI(3)K) presente na via de sinalização da insulina<sup>(119)</sup>. O aumento de marcadores inflamatórios está relacionado a resistência à insulina pelo aumento da fosforilação do substrato 1 do receptor (IRS-1) de insulina em serina via JNK e ERK1/2 atrapalhando a translocação do GLUT4, prejudicando a captação de glicose insulino-estimulada<sup>(120)</sup>.

No estudo de MORITA e colaboradores<sup>(121)</sup>, verificou-se que a incubação de células musculares com nicotina e palmitato provocava quadro de inflamação e estresse oxidativo, que culminava em ativação da via da PKC $\theta$  (proteína cinase C,

tipo  $\theta$ ), NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , o que, em última instância prejudicava a capacidade de translocação de transportador GLUT4 para a membrana plasmática das células.

Ao calcularmos a quantidade de GLUT4 translocável (Fig. 14) para a membrana plasmática e, portanto, capaz de captar glicose no tecido muscular, não foram observadas diferenças estatísticas significantes, porém houve redução discreta na quantidade de GLUT4 translocada no grupo FS comparado a CS, sugerindo um efeito negativo do fumo sobre este evento.

Quando somados os conteúdos totais de GLUT4 encontrados nas duas frações de membranas celulares (MP e M) no músculo sóleo (Tabela 13), foi verificada semelhança entre os grupos controle (CS) e fumante (FS), demonstrando que o tabagismo parece realmente não interferir na tradução de GLUT4 neste tecido e somente na translocação.

Em 1999, RINCÓN e colaboradores<sup>(49)</sup> mostraram que o tabagismo possui um profundo efeito no transporte de glicose no músculo esquelético, mas que as alterações verificadas não podem ser explicadas por prejuízos na expressão da proteína GLUT4. Em seu trabalho, eles evidenciaram que o transporte basal de glicose é bastante elevado, enquanto que transporte de glicose insulino-estimulado é prejudicado em tabagistas e que isto pode estar relacionada ao aumento de AGL sérico e triglicérides. Assim, aqui neste modelo utilizado é possível que o tabagismo não esteja interferindo diretamente na expressão do GLUT4, mas na via de sinalização insulínica ou translocação. A literatura aponta que o TNF- $\alpha$  é um componente chave na inflamação tabaco-induzida<sup>(122)</sup> e que a exposição crônica a esta citocina prejudica a captação de glicose insulino-mediada e a translocação do GLUT4, sem afetar, no entanto, o conteúdo de transportador<sup>(123)</sup>.

Ainda, considerando o conteúdo de RNAm e o conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo, observa-se discrepância entre os dois no grupo FS, sugerindo que o tabagismo pode estar regulando a tradução da proteína GLUT4 no músculo oxidativo, interferindo em algum evento pós-transcricional do gene do GLUT4: reduzindo eficiência de tradução do gene, gerando moléculas de RNAm mais instáveis ou reduzindo o “turnover” da proteína GLUT4. A ocorrência de regulação

pós-transcricional na expressão do gene do GLUT4 tem sido descrita no músculo esquelético e cardíaco em várias situações, como nas alterações na cauda de poliadenilação (poli-A) do RNAm do GLUT4<sup>(124)</sup> e a regulação pós-transcricional exercida pelos MicroRNAs (miRNAs) <sup>(153)</sup>. Baseados nisso, podemos propor que no músculo sóleo onde o conteúdo de RNAm aumentou sem alterar o conteúdo de proteína possa ter ocorrido um destes eventos.

Em relação à prática de exercício físico, foi possível verificar que o conteúdo protéico de GLUT4 na fração microsomal no músculo oxidativo solear dos grupos CE e FE estava aumentado pelo exercício. Um fato importante é que o exercício físico determinou este aumento até mesmo na membrana plasmática do grupo fumante exercitado comparado ao fumante não-exercitado. E quando calculado o conteúdo total de transportador (somatória das duas frações de membranas celulares) verificou-se aumento nos dois grupos exercitados comparados aos grupos sedentários, evidenciando mais uma vez, que o exercício é benéfico para a homeostasia glicídica, independente da presença de tabagismo.

O músculo esquelético tem sido identificado como um órgão endócrino que produz e libera citocinas e estudos recentes mostram que a atividade física induz aumento nos níveis de citocinas com propriedades anti-inflamatórias<sup>(125)</sup>. Durante o exercício, a interleucina 6 (IL-6) é produzida pela fibra muscular. Estudos demonstram que esta citocina apresenta características anti e pró-inflamatórias tecido-dependentes, uma vez que, pode desenvolver um papel importante na gênese da resistência a insulina no tecido adiposo<sup>(126)</sup> e fígado<sup>(127)</sup>, mas também pode promover benefícios na captação de glicose no músculo esquelético<sup>(128)</sup>.

Em 2006, AL-KHALILI e colaboradores<sup>(129)</sup> demonstraram que a IL-6 aumentou a produção de glicogênio, aumentou a captação de glicose e oxidação de ácidos graxos, concomitantemente com aumento na fosforilação de AMPK e na atividade da PI3(K) em cultura de células musculares esqueléticas.

A literatura indica que esta citocina estimula o aparecimento de outras citocinas anti-inflamatórias, tais como, a interleucina 10 (IL-10) e o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1ra) e também demonstra exercer efeitos inibitórios sobre a produção de TNF- $\alpha$  <sup>(130)</sup>. Como já mencionado anteriormente TNF- $\alpha$  está

relacionado a um prejuízo na captação de glicose insulino mediada no músculo esquelético e adiposo <sup>(40; 41; 123)</sup> e aumento da IL-6 com subsequente redução de TNF- $\alpha$ , provocados pelo exercício, estaria oferecendo proteção contra um quadro de resistência a insulina.

Assim, o exercício físico regular aparece como fator benéfico no tratamento de doenças associadas à inflamação sistêmica crônica e de baixo grau, como o diabetes tipo 2 <sup>(125)</sup> e pode inibir os efeitos deletérios provocados pelo tabagismo.

No músculo EDL, não foram verificadas diferenças estatísticas no conteúdo de RNAm do GLUT4 entre os grupos estudados (Fig. 15), diferentemente do observado no músculo oxidativo, indicando que o fumo não interfere na transcrição do gene do GLUT4 na musculatura glicolítica.

Entretanto, nas análises de conteúdo protéico de GLUT4 (por micrograma de proteína e por grama de tecido) na fração de membrana plasmática no músculo EDL (Fig.16), foi encontrada redução significativa de transportador nos animais tabagistas sedentários, o que não foi revertido com o exercício físico, sugerindo que aparentemente o fumo pode prejudicar a tradução ou translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática. Adicionalmente na análise de expressão de proteína GLUT4 na fração microsomal (Fig. 17), somente o grupo exercitado não fumante apresentou um aumento considerável (45%) de GLUT4. Considerando-se todo o conteúdo de proteína transportadora GLUT4 não se observou diferença significativa entre os grupos, havendo correlação exata entre conteúdo de RNAm e de proteína, diferindo da musculatura oxidativa.

Portanto, pode-se dizer que o fumo e o exercício parecem modular a expressão de GLUT4 de maneira fibro-específica, com a musculatura oxidativa sendo mais sensível às condições tratadas no estudo, o que está de acordo com a literatura, a qual sugere que os fatores transcricionais envolvidos na expressão de GLUT4 têm maior atividade na musculatura oxidativa contra a musculatura glicolítica, como uma consequência da grande atividade dos sítios de ligação de MEF2. Observações recentes mostram que o músculo sóleo apresenta um nível de fosforilação maior para MEF2A e MEF2D do que o músculo gastrocnêmio <sup>(75)</sup>.

De fato a literatura aponta que o GLUT4 é diferencialmente expresso nas fibras glicolíticas e oxidativas<sup>(76, 131)</sup>, e que cada fibra muscular apresenta grau de atividade de acordo com o nível de fosforilação dos fatores transcricionais que podem variar de maneira fibro-específica<sup>(75)</sup>, porém, estes mecanismos não estão completamente elucidados.

Estudos em animais e humanos apontam que o ambiente hipóxico crônico pode induzir adaptações celulares, tais como aumentada densidade capilar, aumento do conteúdo de mioglobina muscular e que pode ocorrer uma mudança no metabolismo energético e na predominância do tipo de fibra muscular<sup>(132,133,134)</sup>. A literatura apresenta que existe aumento significativo no percentual de fibras glicolíticas em ratos expostos à hipóxia crônica<sup>(133)</sup>, uma vez que esta induz a transição de fibras do tipo I e IIa para fibras do tipo IIb<sup>(135)</sup>.

SAULEDA e colaboradores<sup>(134)</sup> verificaram que pacientes com síndrome da apnéia obstrutiva do sono (que se constitui de hipóxias intermitentes durante o sono) possuíam maior diâmetro de suas fibras do tipo II. Em estudos feitos com material coletado através de biópsias do músculo vasto lateral de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), que é uma patologia relacionada à resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas e/ou gases tóxicos, sobretudo a fumaça de cigarro, foi observado que nestes pacientes havia redução significativa de enzimas oxidativas e manutenção ou aumento de enzimas glicolíticas<sup>(136)</sup>. Foi encontrado também que em pacientes com DPOC severa e hipoxemia crônica possuem menor quantidade de fibras do tipo IIa e mais fibras do tipo IIb em seu bíceps braquial<sup>(137)</sup>. GREEN e colaboradores<sup>(138)</sup> demonstraram que pacientes com DPOC apresentavam menor quantidade de GLUT4 no músculo vasto lateral e que a DPOC resulta em redução do potencial de fosforilação, uma aparente elevação do fluxo glicolítico e um defeito potencial no transporte de glicose e lactato.

Sabe-se que a sensibilidade insulínica se correlaciona com a proporção de fibras do tipo I. Especificamente o transporte de glicose insulino-estimulado é maior em músculo esquelético rico em fibras do tipo I, possivelmente relacionado ao elevado conteúdo de GLUT4. Assim uma mudança na distribuição dos tipos de

fibra (de tipo I para tipo II) altera a atividade de enzimas oxidativas e glicolíticas, o que está intimamente relacionada a resistência a insulina <sup>(139)</sup>. Em indivíduos obesos e diabéticos, a distribuição do tipo de fibra muscular é maior em direção as fibras do tipo IIb glicolíticas, o que está associado com menor capacidade oxidativa e reduzido conteúdo de GLUT4. Em paralelo com as alterações nos tipos de fibra, os indivíduos insulino-resistentes ou intolerantes à glicose podem ter reduzida densidade capilar o que pode reduzir a taxa de difusão da insulina ao seu receptor também contribuindo para a resistência a insulina <sup>(139)</sup>. Com isto podemos inferir que talvez as fibras glicolíticas sejam menos suscetíveis aos danos causados pela hipóxia, mas que o tabagismo também pode estar afetando o metabolismo glicídico nesta musculatura.

Fumar é um poderoso fator de risco para aterosclerose e doenças cardiovasculares<sup>(102)</sup>. O tabagismo causa disfunção vasomotora, inflamação, modificação no perfil lipídico, agregação plaquetária e alteração em fatores anti-trombóticos e pró-trombóticos<sup>(10)</sup>. Fumantes tendem a ser insulino-resistentes, hiperinsulinêmicos e dislipidêmicos, com evidências de disfunção endotelial, quando comparados com não fumantes <sup>(140)</sup>. O tabagismo causa inflamação e estresse oxidativo<sup>(141)</sup> e evidências indicam que a superprodução crônica e aguda de espécies reativas de oxigênio (EROS), sob condições fisiopatológicas é parte integrante do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2.

Embora o músculo cardíaco não seja o tecido mais importante de metabolismo da glicose pós-prandial, estudos clínicos revelaram que a sensibilidade à insulina é um fator de risco para mortalidade em indivíduos com insuficiência cardíaca coronariana <sup>(142)</sup>. Além disso, foi demonstrado que as medições de captação de glicose insulino-estimulada são marcadores de prognóstico da doença coronariana<sup>(142)</sup>.

A glicose utilizada pelo coração é derivada do plasma, de estoques intracelulares de glicogênio ou de produto da via gliconeogênica. O transporte de glicose para o interior dos cardiomiócitos ocorre a favor de um gradiente de concentração e é regulado por transportadores específicos, os GLUTs. A isoforma predominante no cardiomiócito adulto é o GLUT4, que é sensível à insulina.



A expressão de transportador de glicose no coração é alterada em vários estados patológicos como diabetes, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca. Observa-se em muitos modelos experimentais de diabetes uma reduzida expressão de GLUT4 no coração. Esses achados refletem um efeito combinado de alteração na expressão de transportador, diminuída sinalização e prejuízo na translocação <sup>(143)</sup>.

Associado ao fumo, um estilo de vida sedentário está relacionado ao progresso de fatores de risco cardiovasculares, como insulino-resistência, obesidade, dislipidemia, hipertensão e inaptidão física<sup>(144)</sup>. O exercício é conhecido por aumentar a captação e utilização de ácidos graxos livres e glicose no coração. Durante o exercício, a função contrátil e metabolismo do coração são regulados de forma complexa por um conjunto de vias de sinalização, incluindo receptores adrenérgicos e mecanismos cálcio-ativados <sup>(145)</sup>.

Os processos de sinalização que levam a translocação do GLUT4 no coração são complexos e podem depender de vias combinadas ou relacionadas que operam através de proteínas cinases ativadas como AKT, AMPK, PKCs e proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK)<sup>(146)</sup>. Assim como no músculo esquelético, a ativação da AMPK tem papel importante na mediação do aumento da captação de glicose e oxidação dos ácidos graxos que ocorrem com o aumento da atividade contrátil no músculo cardíaco<sup>(145)</sup>.

A literatura indica que o diabetes tipo 2 e a aterosclerose parecem dividir uma mesma base fisiopatológica de inflamação crônica e sistêmica <sup>(147)</sup> e que o fumo pode estar na gênese de ambas patologias <sup>(10,140)</sup>. O fumo está associado ao aumento de marcadores inflamatórios como a proteína C-reativa, dos níveis de moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e selectina-E e do aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  <sup>(122, 148, 149)</sup>. Como já relatado anteriormente estes marcadores inflamatórios parecem atrapalhar a síntese e translocação de GLUT4 na musculatura esquelética.

No coração, pelas análises de RNAm do GLUT4, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos mostrando que nem o tabagismo e nem o exercício alteram a transcrição de GLUT4 no coração. Os resultados de conteúdo

de proteína expressos em UA/ $\mu$ g de proteína também foram mantidos entre os grupos. Porém pela análise de Conteúdo Total (CT) de proteína GLUT4 por grama de tecido, verificou-se redução de 30% no grupo fumante, provavelmente em virtude dos mecanismos já mencionados relacionados à inflamação e estresse oxidativo. Assim, evidenciou-se um efeito negativo do tabagismo sobre quantidade de transportador na musculatura cardíaca e a literatura aponta que reduzida quantidade de proteína GLUT4 pode contribuir para a resistência insulínica que constitui uma das características de desequilíbrio metabólico dentro da fisiopatologia da insuficiência cardíaca crônica<sup>(150)</sup>.

O trabalho de OSBORN e colaboradores<sup>(151)</sup> demonstra que o exercício físico pode aumentar o conteúdo protéico e de RNAm de GLUT4 em ratos diabéticos e que este aumento de transportador proporcionado pelo exercício pode contribuir para uma melhor oxidação da glicose no miocárdio e melhorar o desempenho cardíaco. Este mecanismo de aumento da captação de glicose pelo aumento de GLUT4 é importante também para a proteção miocárdica durante uma lesão isquêmica, por exemplo.

Durante uma isquemia miocárdica, o coração adapta-se rapidamente a uma condição de baixo suprimento de oxigênio e nutrientes, com um desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico. Nesta fase o aumento da via glicolítica é o maior mecanismo pelo qual o coração mantém as concentrações ATP frente à prejudicada fosforilação oxidativa e neste caso o GLUT4 é o maior determinante do fluxo glicolítico para as células cardíacas<sup>(152)</sup>.

Assim torna-se conveniente a prática de exercícios físicos de modo a melhorar o desempenho cardíaco e melhorar a captação de glicose pelo aumento de conteúdo e translocação de GLUT4. No presente estudo, independente da presença ou não de tabagismo, o exercício *per se* aumentou a quantidade de proteína GLUT4 no coração, mesmo sem incremento no conteúdo de RNAm, indicando uma regulação positiva sobre a tradução desta proteína, nos grupos CE (aumento de 19%) e FE (aumento de 56,6%) comparados aos seus grupos sedentários.

Com este estudo, adicionalmente aos males já relatados na literatura, verificou-se o que o fumo tem um importante efeito negativo sobre o metabolismo glicídico em tecidos musculares esqueléticos (tipo I e tipo IIb) e cardíaco. Também constatou-se que o fumante que realiza atividade física tem maior probabilidade de captar/manejar a glicose comparado ao fumante sedentário, mantendo a homeostasia glicídica de maneira adequada.



## 6. CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho evidenciamos que:

- O tabagismo reduz gravemente a sensibilidade à insulina, o que pode ser revertido com a prática de atividade física moderada.
- O tabagismo parece estimular a transcrição do gene do GLUT4 no músculo esquelético oxidativo sóleo, porém provoca uma redução no conteúdo de proteína GLUT4 na membrana plasmática, com aumento associado de transportador na fração microssomal, sugerindo que o fumo pode estar interferindo na capacidade de translocação do GLUT4 e prejudicar a captação de glicose no tecido muscular oxidativo.
- O exercício físico moderado, por sua vez, melhora a transcrição e a tradução do transportador de glicose GLUT4 no músculo oxidativo, mesmo sob influência do tabagismo, contribuindo para a redução dos efeitos deletérios causados pelo fumo.
- No músculo glicolítico EDL nem o tabagismo nem o exercício físico alterou de forma importante a expressão de GLUT4.
- O fumo e o exercício não alteraram a expressão de RNAm do GLUT4 na musculatura cardíaca, porém o fumo reduziu e o exercício aumentou a quantidade de proteína GLUT4 no coração, evidenciando regulação pós-transcricional.

Portanto, pode-se dizer que o fumo e o exercício parecem modular a expressão de GLUT4 de maneira fibro-específica, com a musculatura oxidativa sendo mais sensível que a glicolítica. O exercício propiciou efeito positivo neste

estudo, sugerindo que o fumante que realiza atividade física tem melhor probabilidade de captar/manejar melhor a glicose comparado ao fumante sedentário.

Diante desses resultados, conclui-se que fumar, além de todas as alterações já descritas em literatura envolvendo doenças respiratórias, cardiovasculares e vários tipos de câncer pode também ser prejudicial à homeostasia glicídica, e que a prática de exercício físico moderado recorrente pode ser um método importante para combater os efeitos deletérios causados pelo fumo, melhorando, sobretudo a captação de glicose.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) CUNHA GH, JORGE ARC, FONTELES MMF, SOUSA FCF, VIANA GSB, VASCONCELOS SMM. Nicotina e tabagismo. Revista eletrônica pesquisa médica. 2007; 1(4): 1-10.
- (2) OLIVEIRA AF, VALENTE JG, LEITE IC. Aspectos da mortalidade atribuível ao tabaco: revisão sistemática. Rev Saúde Pública 2008;42(2):335-345.
- (3) ALMEIDA AF, MUSSI FC. Tabagismo: conhecimentos, atitudes, hábitos e grau de dependência de jovens fumantes em Salvador. Rev. Esc. Enferm. USP 2006; 40(4):456-463.
- (4) LOLIO CA, SOUZA JMP, SANTO AH, BUCHALLA, CM. Prevalência de tabagismo em localidade urbana da região sudeste do Brasil. Rev. Saúde Pública 1993, 27(4): 262-265.
- (5) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Confronting the tobacco epidemic in an era of trade liberalization. Geneva: WHO, 2003.
- (6) CARVALHO JT. O tabagismo visto sob vários aspectos. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2000.
- (7) ZANINI RR, MORAES AB, TRINDADE ACA, RIBOLDI J, MEDEIROS LR. Prevalência e fatores associados ao consumo de cigarros entre estudantes de escolas estaduais do ensino médio de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2002. Cad. Saúde Pública 2006; 22(8):1619-1627.
- (8) WONG LS, GREEN HM, FEUGATE JE, YADAV M, NOTHNAGEL EA, MARTINS-GREEN M. Effects of "second-hand" smoke on structure and function of fibroblasts, cells that are critical for tissue repair and remodeling. BMC Cell Biology 2004; 5: 1-14.
- (9) PRECIOSO J, LOPEZ MJ, CALHEIROS JM, MACEDO M, ARIZA C, SANCHEZ F, et al. Poluição do ar interior provocada pelo fumo do cigarro em locais públicos de Portugal. Rev Saúde Pública 2007;41(5):808-813
- (10) AMBROSE JA, BARUA RS. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease: An Update. J Am Coll Cardiol 2004;43(10):1731–1737
- (11) MELLO PRB, PINTO GR, BOTELHO C. Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. J. Pediatr 2001; 77(4): 257-264.



- (12) FURTADO RD. Implicações Anestésicas do Tabagismo. Rev Bras Anesthesiol 2002; 52(3): 354 – 367.
- (13) SPADA C, TREITINGER A, SOUZA M A. Prevalência do tabagismo em doadores de sangue da região serrana de Santa Catarina - Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2006; 28(1):19-23.
- (14) NUNES E. Consumo de tabaco. Efeitos na saúde. Rev Port Clin Geral 2006;22:225-244
- (15) FRANKEN RA, NITRINI G, FRANKEN M, FONSECA AJ, LEITE JCT. Nicotina. Ações e Interações. Arq Bras Cardiol 1996; 66 (1): 371-373.
- (16) CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN H G, SAAD MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metab 2002; 46(4): 419-425.
- (17) ZECCHIN HG, CARVALHEIRA JBC, SAAD MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2004;4:574-589
- (18) MACHADO UF, SCHAAN BD, SERAPHIM PM. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab 2006; 50 (2):177-189.
- (19) MUECKLER M, CARUSO C, BALDWIN SA, PANICO M, BLENCH M, MONIS HR, ALLARD WJ, LIENHARD GE, LODISH HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 1985; 299: 941-45.
- (20) SERAPHIM PM. A resistência à insulina reduz a expressão do gene do GLUT4 na presença e na ausência da obesidade [Tese de doutorado] São Paulo(SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.
- (21) FU Y, LUO L, LUO N, GARVEY WT. Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. Nutrition & Metabolism 2006; 3:28.
- (22) SHULMAN GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 2000; 106: 171–176.
- (23) ROPELLE ER, PAULI JR, CARVALHEIRA JBC. – Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. Motriz, Rio Claro, 2005; 11(1):49-55.
- (24) GOODYEAR LJ. AMP-activated protein kinase: A critical signaling intermediary for exercise-stimulated glucose transport? Exercise and sport sciences reviews 2000, 28(3): 113-116.

- (25) JESSEN N, GOODYEAR L. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005, 99:330-337.
- (26) WEITZMAN M, COOK S, AUINGER P, FLORIN TA, DANIELS S, NGUYEN M, et al. Tobacco Smoke Exposure Is Associated With the Metabolic Syndrome in Adolescents. *Circulation*. 2005;112:862-869.
- (27) PRICE TB, KRISHNAN-SARIN S, ROTHMAN DL. Smoking impairs muscle recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E116–E122.
- (28) CHIOLERO A, FAEH D, PACCAUD F, CORNUZ J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008;87:801–809.
- (29) ELIASSON B, ATTVALL S, TASKINEN MR, SMITH U. The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1994;14:1946-1950.
- (30) LYRA, R; OLIVEIRA, M; LINS, D; CAVALCANTI, N. – Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2006; 50(2):239-249
- (31) CHAN J, RIMM EB, COLDITZ G, STAMPFER M, WILLET W. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994; 17:1-10.
- (32) RIMM, E.B; MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G. A; WILLET, W. C., ROSNER, B; HENNEKEN, S C. H; SPEIZER F. E. – Cigarette smoking and the risk of diabetes in women. *Am. J. Public Health* 1993; 83:211-214.
- (33) GAGLIARDI A RT. Resistência à insulina. *Atheros*, 2002; 13(2): 39-41.
- (34) WEIS L, SCHWANCK GB, SILVA JS, LENZI LGS, MACHADO MB, BALOTIN R, et al. O papel da Proteína C Reativa (PCR) na detecção precoce de inflamação sistêmica em fumantes. *Revista da AMRIGS, Porto Alegre*, 2007; 51(2):128-131.
- (35) ANDRADE JUNIOR, DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol* 2005; 31(1):60-8.
- (36) YANG SR, CHIDA AS, BAUTER MR, SHAFIQ N, SEWERYNIAK K, MAGGIRWAR SB, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(1):L46-57.
- (37) CARVALHO MH C; COLAÇO AL; FORTES ZB. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2006; 50(2): 304-12.

(38) FERNÁNDEZ-REAL JM, RICART W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24:278-301.

(39) SPRANGER J, KROKE A, MÖHLIG M, HOFFMANN K, BERGMANN MM, RISTOW M, et al. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52:812–17.

(40) SAGHIZADEH M, ONG JM, GARVEY WT, HENRY RR, KERN PA. The Expression of TNF- $\alpha$  by Human Muscle Relationship to Insulin Resistance. *J Clin Invest* 1996; 97(4): 1111–1116.

(41) HOTAMISLIGIL GS, MURRAY DL, CHOY LN, SPIEGELMAN BM. TNF- $\alpha$  inhibits signaling from insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91:4854-8.

(42) HOTAMISLIGIL GS, SPIEGELMAN BM. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994.43:1271–1278.

(43) DE LUCA C, OLEFSKY JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008; 582(1):97-105.

(44) HOUSTON TK, PERSON SD, PLETCHER MJ, LIU K, IRIBARREN C, KIEFE CI. Active and passive smoking and development of glucose intolerance among young adults in a prospective cohort: CARDIA study. *BMJ* 2006; 332:1064-1069.

(45) TALAMINI G, BASSI C, FALCONI M, SARTORI N, SALVIA R, RIGO L, et al. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 1999;44:1303-11.

(46) MAISONNEUVE P, LOWENFELS AB, MÜLLHAUPT B, CAVALLINI G, LANKISCH PG, ANDERSEN JR, et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 2005;54:510–514

(47) GRASSI G, SERAVALLE G, CALHOUN DA, BOLLA GB, GIANNATTASIO C, MARABINI M, DEL A. Mechanisms responsible for sympathetic activation by cigarette smoking in humans. *Circulation*. 1994; 90: 248-253.

(48) JENSEN JA, GOODSON WH, HOPF HW, HUNT TK. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg*. 1991; 126:1131-4.

(49) RINCÓN J, KROOK A, GALUSKA D, WALLBERG-HENRIKSSON H, ZIERATH JR. Altered skeletal muscle glucose transport and blood lipid levels in habitual cigarette smokers. *Clinical Physiology* 1999; 19(2):135-142.

- (50) LARSEN JJ, HANSEN JM, OLSEN NV, GALBO H, DELA F. The effect of altitude hypoxia on glucose homeostasis in men. *J Physiol* 1997; 504:241-249.
- (51) CARNEIRO G; RIBEIRO FILHO FF; TOGEIRO SM; TUFIK S; ZANELLA M T. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina.. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(7):1035-1040
- (52) OLTMANNS KM, GEHRING H, RUDOLF S, SCHULTES B, ROOK S, SCHWEIGER U, et al. Hypoxia Causes Glucose Intolerance in Humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1231–1237.
- (53) LIYORI N, ALONSO LC, LI J, SANDERS MH, GARCIA-OCANA A, O'DOHERTY RM, et al. Intermittent Hypoxia Causes Insulin Resistance in Lean Mice Independent of Autonomic Activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:851–857.
- (54) LOUIS M, PUNJABI NM. Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers. *J Appl Physiol* 2009;106:1538-1544.
- (55) MU J, BROZINICK JT JR, VALLADARES O, BUCAN M, BIRNBAUM MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction-and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*. 2001;7(5):1085-94.
- (56) ZHANG JZ, BEHROOZ A, ISMAIL-BEIGI F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *American Journal of Kidney Diseases*, 1999; 34:189-202
- (57) BLOTNER H. Effects of prolonged physical inactivity on tolerance sugar. *Arch Intern Med* 1945;75:39-44.
- (58) CIOLAC, E.G; GUIMARÃES, G. V. – Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte*, 2004; 10(4): 319-24.
- (59) DE ANGELIS K, PUREZA DY, FLORES LJF, RODRIGUES B, MELO KFS, SCHAAN BD, IRIGOYEN MC. Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(6):1005-13.
- (60) HENRIKSEN, E.J. Exercise Effects of Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance *J Appl Physiol* 2002; 93:788–796.
- (61) LUCIANO, E; ROSTOM DE MELLO, M.A. – Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev. paul. Educ. Fís*. 1998; 12(2): 202-209.

- (62) TERAN-GARCIA M, RANKINEN T, KOZA RA, RAO DC, BOUCHARD C. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:1168-1178.
- (63) HOLMES, B; DOHM, G.L –Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(7):1202-1206.
- (64) KRANIU GN; CAMERON-SMITH D; HARGREAVES M. Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity. *J Appl Physiol* 2006; 101(3): 934-937.
- (65) THORELL A, HIRSHMAN MF, NYGREN J, JORFELDT L, WOJTASZEWSKI JFP, DUFRESNE SD, et al. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999; 277(4):E733-E741.
- (66) GOMES MR, ROGERO MM, TIRAPEGUI J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Rev Bras Med Esporte* 2005; 11(5):262-66.
- (67) KURTH-KRACZEK EJ, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ, WINDER WW. 5' AMP- activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 1999; 48: 1667-1671.
- (68) SANTOMAURO JÚNIOR AC, UGOLINI MR, SANTOMAURO AT, SOUTO RP. Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52(1):120-125.
- (69) LI J, HU X, SELVAKUMAR P, RUSSELL RR, CUSHMAN SW, HOLMAN GD, YOUNG LH. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E834–E841,
- (70) WRIGHT DC, HUCKER KA, HOLLOSZY JO, HAN DH. Ca<sup>2+</sup> and AMPK Both Mediate Stimulation of Glucose Transport by Muscle Contractions. *Diabetes*, 2004;53(2): 330-335
- (71) ZOPPI CC. Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. *Rev. saúde.com.* 2005; 1(1): 60-70.
- (72) LIMA GA, ANHÊ GF, GIANNOCCO G, NUNES MT, CORREA-GIANNELLA ML, MACHADO UF. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF-1a, and TR  $\alpha$  transcriptional factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E132–E138.
- (73) SILVA JLT, GIANNOCCO G, FURUYA DT, LIMA G A, MORAES P A.C., NACHEF S, BORDIN S, BRITTO L RG, NUNES MT, MACHADO UF. NF-KB, MEF2A, MEF2D and HIF1-a involvement on insulin- and contraction-induced

regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 240: 82–93.

(74) MCGEE SL, HARGREAVES M. Exercise And Skeletal Muscle Glucose Transporter 4 Expression: Molecular Mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006; 33: 395–399.

(75) ZORZANO A, PALACÍN M, GUMA A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2005, 183, 43–58.

(76) SONG, X.M; RYDER, J.W; KAWANO, Y; CHIBALIN, A.V; KROOK, A; ZIERATH, J.R. Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(46):.R1690–R1696.

(77) DAUGAARD, R.J; NIELSEN, J.N; KRISTIANSEN, S; ANDERSEN, J.L; HARGREAVES M; RICHTER, E.A. Fiber Type–Specific Expression of GLUT4 in Human Skeletal Muscle Influence of Exercise Training. *Diabetes* 2000; 49:1092–1095.

(78) MARETTE, A; RICHARDSON, J.M; RAMLAL, T; BALON, T.W; VRANIC, M; PESSIN, J.E; KLIP, A. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am. J. Physiol.* 1992;263:C443–C452.

(79) GASTER, M; POULSEN, P; HANDBERG, A; SCHRÖDER, H.D; BECK-NIELSEN, H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 278, p.910-916, 2000.

(80) RICHARDSON JM, BALON TW, TREADWAY JL, PESSIN JE. Differential regulation of glucose transporter activity and expression in red and white skeletal muscle. *The journal of biological chemistry* 1991; 266:12690-12694.

(81) CEDON FILHA SP. Efeitos do fumo passivo no aparelho mucociliar de ratos. 1994. 101f. Tese (Doutorado em Medicina – Pneumologia) – universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

(82) ANDREW RJ. Treadmill for small laboratory animals. *J. Appl. Physiol.* 1965; 20(3):572-574.

(83) CAMARGO FILHO JCS, VANDERLEI LCM, CAMARGO RCT, OLIVEIRA DAR, OLIVEIRA JÚNIOR SA, DAL PAI V, BELANGERO WD. Análise histológica, histoquímica e morfológica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq. Ciênc. Saúde, São Paulo*, 2005; 12(4):196-199.

- (84) 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; 81:221-224.
- (85) CASTERDELI, E; PAIVA, S.A.R; MATSUBARA, B. B; MATSUBARA, L. S; MINICUCCI, M. F; AZEVEDO, P. S; CAMPANA, A. O; ZORNOFF, L. A. M. A. Exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2005; 84 (4):320-324.
- (86) SERAPHIM PM, NUNES MT, MACHADO UF. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001; 34: 1353-1362.
- (87) YONEMITSU S, NISHIMURA H, SHINTANI M, INOUE R, YAMAMOTO Y, MASUZAKI H, et al. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes* 2001; 50:1093–1101.
- (88) LIMA FB, MACHADO UF, BARTOL I, SERAPHIM PM, SUMIDA DH, MORAES SM, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1998;275(6Pt1):E934-E941.
- (89) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193:265-275.
- (90) GARFIN, D. E. One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 1990; 182: 425-41.
- (91) TIMMONS, T. M. & DUNBAR, B. Protein Blotting and Immunodetection. *Methods Enzymol.*, 182: 679-88, 1990.
- (92) KRUEGER, N.J & HAMMOND, J.B.W. Immunodetection of proteins on "Western" blots using <sup>125</sup>I labeled protein A. *Methods Mol. Biol.*, 1988; 3: 409-17.
- (93) SAIRENCHI, T; ISSO, H; NISHIMURA, A; HOSODA, T; IRIE, F; SAITO, Y; MURAKAMI A, FUKUTOMI, H. Cigarette Smoking and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus among Middle-aged and Elderly Japanese Men and Women. *Am J Epidemiol*; 2004;160:158–162
- (94) GONÇALVES-SILVA, R.M.V, LEMOS-SANTOS, M.G, BOTELHO C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J Pneumol.* 1997, 23(3):124-130.
- (95) JAMERSON KA, JULIUS S, GUDBRANDSSON T, ANDERSSON O, BRANT DO. Reflex sympathetic activation induces acute insulin resistance in the human forearm. *Hypertension* 1993;21;618-623

- (96) EGAN BM. Insulin Resistance and the Sympathetic Nervous System. *Current Hypertension Reports* 2003, 5:247–254
- (97) LOPES HF, EGAN BM. Desequilíbrio Autonômico e Síndrome Metabólica: Parceiros Patológicos em uma Pandemia Global Emergente *Arq Bras Cardiol* 2006; 87: 538-547
- (98) CARVALHEIRA JBC. Hiperatividade Simpática na Obesidade *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52: 6-7
- (99) FLORES-RIVEROS JR, KAESTNER KH, THOMPSON K S, LANE MD. Cyclic AMP-induced transcriptional repression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: identification of a promoter region required for down-regulation of transcription. *Biochemical and biophysical research communications* 1993;194(3):1148-1154.
- (100) MULDER AH, TACK CJ, OLTHAAR AJ, SMITS P, SWEEP FCGJ, BOSCH RR. Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E627–E633.
- (101) PIROLI GG, GRILLO CA, REZNIKOV LR, ADAMS S, MCEWEN BS, CHARRON MJ, REAGAN LP. Corticosterone Impairs Insulin-Stimulated Translocation of GLUT4 in the Rat Hippocampus. *Neuroendocrinology* 2007;85:71-80
- (102) FRÖHLICHA M, SUNDC M, LÖWELD H, IMHOFA A, HOFFMEISTERA A, KOENIG W. Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men: Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95). *European Heart Journal*. 2003; 24: 1365–1372
- (103) SAVAGE DB, PETERSEN KF, SHULMAN GI. Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Possible Links With Inflammation. *Hypertension*. 2005;45:828-833.
- (104) LEE H, JOE KH, KIM W, PARK J, LEE DH, SUNG KW, et al. Increased leptin and decreased ghrelin level after smoking cessation. *Neurosci Lett* 2006;409(1):47-51.
- (105) PISINGER C, JORGENSEN T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter99 study. *Prev Med* 2007;44(4):290-5.
- (106) FOY CG, BELL RA, FARMER DF, GOFF DC, WAGENKNECHT LE. Smoking and Incidence of Diabetes Among U.S. Adults. *Diabetes Care* 2005; 28:2501–2507.



- (107) YANBAEVA DG; DENTENER MA; CREUTZBERG EC; WESSELING G; WOUTERS EFM. Systemic Effects of Smoking. *Chest* 2007; 131: 1557–1566.
- (108) UCHIMOTO S, TSUMURA K, HAYASHIT T, SUEMATSUT C, ENDOT G, FUJII S, OKADA K. Impacto f cigarette smoking on the incidence of type 2 diabetes mellitus in middle-aged Japanese men: the Osaka helth Survey. *Diabet. Med* 1999; 16: 951-955.
- (109) GUPTA V, TIWARI S, AGARWAL CG, SHUKLA P, CHANDRA H, SHARMA P. Effect Of Short Term Cigarette Smoking On Insulin Resistance And Lipid Profile In Asymptomatic Adults. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006; 50(3): 285–290.
- (110) KANG Y, IMAMURA H, MASUDA R, NODA Y. Cigarrete smoking and blood insulin, glucose, and lipids in young Japanese women. *Journal of health science*, 2009; 55(2):294-299
- (111) VANCEA DMM, VANCEA JN; PIRES MIF; REIS MA; MOURA RB; DIB SA. Effect of frequency of physical exercise on glycemic control and body composition in type 2 diabetic patients. *Arq. Bras. Cardiol.* 2009; 92(1):23-30.
- (112) SILVA CA, LIMA WC. Efeito Benéfico do Exercício Físico no Controle Metabólico do Diabetes Mellitus Tipo 2 à Curto Prazo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2002, 46(5): 550-556,
- (113) GELONEZE B, TAMBASCIA MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(2): 208-215.
- (114) 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*; v. 9, p.290–296, 1999.
- (115) WRIGHT DC, GEIGER PC, HOLLOSZY JO, HAN D. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1062–E1066.
- (116) GUAN F, YU B, QI G, HU J, ZENG D, LUO J. Chemical Hypoxia-induced Glucose Transporter-4 Translocation in Neonatal Rat Cardiomyocytes *Archives of Medical Research* 2008; 39: 52-60
- (117) EZAKI, O. Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 241: 1-6.

- (118) ZHANG J, LIU Y, SHI J, LARSON DF, ROSSWATSON R. Side-Stream Cigarette Smoke Induces Dose-Response in Systemic Inflammatory Cytokine Production and Oxidative Stress. *Exp Biol Med*. 2002; 227:823-29.
- (119) RUDICH A, TIROSH A, POTASHNIK R, HEMI R, KANETY H, BASHAN N. Prolonged Oxidative Stress Impairs Insulin-Induced GLUT4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes* 47:1562-1569, 1998
- (120) D'ALESSANDRIS C, LAURO R, PRESTA I, SESTI G. C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia* 2007; 50:840-849.
- (121) MORITA, T; TERADA, E; TATEBE, J; YOSHINO, G; SAJI, T; YAMAZAKI, J. Nicotine impaires GLUT4 translocation in skeletal muscle cells through mechanisms involving oxidative stress/PKC theta/nuclear factor-Kb/AKT pathway. *Journal of clinical lipidology*, 2008; 2(5):S19-S20.
- (122) CHURG A, DAI J, TAI H, XIE C, WRIGHT JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166: 849-854.
- (123) LORENZO M, FERNÁNDEZ-VELEDO S, VILA-BEDMAR R, GARCIA-GUERRA L, DE ALVARO C, NIETO-VAZQUEZ I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci*. 2008.86:E94-E104.
- (124) 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007; 276: 80-87.
- (125) MATHUR N, PEDERSEN BK. Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2008: 1-6.
- (126) LAGATHU C, BASTARD JP, AUCLAIR M, MAACHI M, CAPEAU J, CARON M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003; 311: 372-379
- (127) KLOVER PJ, CLEMENTI HA, MOONEY RA. Interleukin-6 Depletion Selectively Improves Hepatic Insulin Action in Obesity. *Endocrinology*, 2005; 146(8): 3417-3427

- (128) GRAY SR, RATKEVICIUS A, WACKERHAGE H, COATS P, NIMMO MA. The effect of interleukin-6 and the interleukin-6 receptor on glucose transport in mouse skeletal muscle. *Exp Physiol*, 2009;94: 899–905.
- (129) AL-KHALILI L, BOUZAKRI K, GLUND S, LONNQVIST F, KOISTINEN HA, KROOK A. Signaling Specificity of Interleukin-6 Action on Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Molecular Endocrinology* 2006; 20: 3364–3375.
- (130) PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays in Biochemistry* 2006; 42: 105-117.
- (131) KNIGHT JB, EYSTER CA, GRIESEL BA, AND ANN LOUISE OLSON. Regulation of the human GLUT4 gene promoter: Interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. *PNAS* 2003;100(25): 14725–14730.
- (132) HOPPELER H, VOGT M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. 2001; 204:3133–3139.
- (133) ITOH K, MORITANI T, ISHIDA K, HIROFUJI C, TAGUCHI S, ITOH M. Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1990;60(5):331-6.
- (134) SAULEDA J, GARCIA-PALMER FJ, TARRAGA S, MAIMÓ A, PALOU A, AGUSTI AGN. Skeletal muscle changes in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Respiratory Medicine*, 2003; 97, 804–810.
- (135) BIGARD AX, SANCHEZ H, BIROT O, SERRURIER B. Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions. *J Appl Physiol*. 2000; 88:479–486.
- (136) DOURADO VZ, TANNI SE, VALE SA, FAGANELLO MM, SANCHEZ FF, GODOY I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(2):161-7.1
- (137) PEREIRA MC, ISAYAMA RN, SEABRA JC, CAMPOS GE, PASCHOAL IA. Distribution and morphometry of skeletal muscle fibers in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic hypoxemia. *Muscle Nerve* 2004; 30:796–798.
- (138) GREEN HJ, BURNETT ME, D'ARSIGNY CL, O'DONNELL DE, OUYANG J, WEBB KA. Altered metabolic and transporter characteristics of vastus lateralis in chronic obstructive pulmonary disease *J Appl Physiol* 2008: 105:879-886.

- (139) JENSEN CB, STORGAARD H, MADSBAD S, RICHTER EA, VAAG AA. Altered Skeletal Muscle Fiber Composition and Size Precede Whole-Body Insulin Resistance in Young Men with Low Birth Weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 1530–1534.
- (140) REAVEN G, TSAO PS. Insulin Resistance and Compensatory Hyperinsulinemia. The Key Player Between Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1044 –7.
- (141) VAN DER VAART H, POSTMA DS, TIMENS W, TEN HACKEN NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004;59:713–721.
- (142) DOEHNER W, RAUCHHAUS M, PONIKOWSKI P, GODSLAND I, VON HAEHLING S, OKONKO D, et al. Impaired Insulin Sensitivity as an Independent Risk Factor for Mortality in Patients With Stable Chronic Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46(6): 1019-1026.
- (143) ABEL ED, KAULBACH HC, TIAN R, HOPKINS JCA, DUFFY J, DOETSCHMAN T, et al. Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *J. Clin. Invest* 1999; 104:1703–1714.
- (144) PAULINELLI JR, OLIVEIRA A. O metabolismo dos carboidratos na perspectiva do exercício físico aplicado à saúde. *Revista Ethos* 2003; 1:27-34.
- (145) COVEN DL, HU X, CONG L, BERGERON R, SHULMAN GI, HARDIE DG, YOUNG LH. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:629-636.
- (146) FAZAKERLEY DJ, LAWRENCE<sup>1</sup> SP, LIZUNOV VA, CUSHMAN SW, HOLMAN GD. A common trafficking route for GLUT4 in cardiomyocytes in response to insulin, contraction and energy-status signaling. *Journal of Cell Science* 2009;122: 727-734
- (147) PRADHAN AD, RIDKER PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *European Heart Journal* 2002; 23: 831–834.
- (148) GONZÁLEZ S, HARDS J, VAN EEDEN S, HOGG JC. The expression of adhesion molecules in cigarette smoke-induced airways obstruction. *Eur Respir J* 1996; 9:1995–2001.
- (149) CAVUSOGLU Y, TIMURALP B, US T, AKGÜN Y, KUDAIBERDIEVA G, GORENEK B, UNAL A, GOKTEKIN O, ATA N. Cigarette Smoking Increases Plasma Concentrations of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease. *Angiology*, 2004; 55(4): 397-402.

(150) DOEHNER W, GATHERCOLE D, CICOIRA M, KRACK A, COATS AJS, CAMICI PG, ANKER SD. Reduced glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle predicts insulin resistance in non-diabetic chronic heart failure patients independently of body composition. *International Journal of Cardiology*, Article in press, 2008:1-6.

(151) OSBORN BA, DAAR JT, LADDAGA RA, ROMANO FD, PAULSON DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *J Appl Physiol* 1997; 82:828-834.

(152) TIAN R, ABEL ED. Responses of GLUT4-Deficient Hearts to Ischemia Underscore the Importance of Glycolysis. *Circulation* 2001;103:2961-66.

(153) HORIE T, ONO K, NISHI H, IWANAGA Y, NAGAO K, KINOSHITA M, et al. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009; 389: 315–320.

(154) JOOST GH, BELL GI, BEST JD, BIRNBAUM MJ, CHARRON MJ, CHEN YT et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:974-976.



## APÊNDICE:

Tabela 7 – Peso corporal médio ao longo de 9 semanas de cuidado animal.

	Semana 1	Semana 3	Semana 6	Semana 9
<b>CS</b>	200,1±19,2 (n=20)	300±11,2 (n=20)	359,6±10,1 (n=20)	382,9±7,6 (n=20)
<b>CE</b>	157,3±14,5 (n=13)	286,6±9,0 (n=13)	323,8±9,3* (n=13)	367,07±9,0 (n=13)
<b>FS</b>	189±16,5 (n=18)	297,8±8,8 (n=18)	347,1±5,1# (n=18)	384,9±5,6 (n=18)
<b>FE</b>	154,4±15,8 (n=14)	281,8±8,0 (n=14)	317,7±7,8* (n=14)	371,1±7,1 (n=14)

Os valores são apresentados como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), expressos em gramas (g). O número de animais está entre parênteses (n=13 a 20). \* $P < 0,05$  vs CS; # $P < 0,05$  vs FE.





**1) ARTIGO SUBMETIDO:****O EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA A SENSIBILIDADE À INSULINA DE RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO**

Patrícia Ebersbach-Silva (1), Thâmara Alves (1), Ágatha Tomoko Sakata Fonseca (1), Márcia Aparecida do Nascimento Oliveira (2), Ubiratan Fabres Machado (2), Patrícia Monteiro Seraphim (1).

(1) Departamento de Fisioterapia - FCT/ UNESP - Rua Roberto Simonsen, 305 - Presidente Prudente – SP – Brasil. (2) Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB-1 / USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - São Paulo – SP – Brasil

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