



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE
CADEIA RAMIFICADA EM RATOS WISTAR OBESOS

Carolina Pasqual Celestrin

Novembro - 2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE
CADEIA RAMIFICADA EM RATOS WISTAR OBESOS**

Carolina Pasqual Celestrin

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Desenvolvimento
Humano e Tecnologias

Novembro - 2018

C392e Celestrin, Carolina Pasqual
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA
RAMIFICADA EM RATOS WISTAR OBESOS /
Carolina Pasqual Celestrin. -- Rio Claro, 2018
54 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Alexandre Gabarra de Oliveira

1. Aminoácidos de Cadeia Ramificada. 2.
Exercício Físico. 3. Resistência à Insulina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

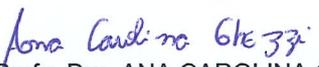
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA EM RATOS WISTAR OBESOS

AUTORA: CAROLINA PASQUAL CELESTRIN

ORIENTADOR: ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: Tecnologias Nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Profa. Dra. ANA CAROLINA GHEZZI
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas - SP


Prof. Dr. GUILHERME ZWEIG ROCHA
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas - SP

Rio Claro, 21 de novembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Muitos dizem que ciência e religião não combinam, mas eu não teria conseguido terminar essa dissertação se não fosse minha fé em Deus e a ajuda Dele para comigo. Deus se mostra muito presente em minha vida e a conquista desse mestrado como todas as outras em minha vida eu ofereço a Ele.

Agradeço ao meu pai Roberto Donizete Citroni Celestrin, que não está presente fisicamente, porém foi fundamental para minha criação e está ao lado Dele olhando as minhas vitórias e iluminando meu futuro. Minha mãe maravilhosa Maria Edi Pasqual Celestrin, meu maior exemplo, muito obrigada por toda a educação que me deu, obrigada pela sua paciência, oração, cuidado e palavras de carinho e conforto em todo esse processo.

Ao meu amor Fernando por ser meu companheiro e meu melhor amigo, por sempre me incentivar, apoiar e por estar presente mesmo estando morando em outro país.

Aos meus avós Accacio Pasqual e Maria Serafim Pasqual, que estão sempre presentes em minha vida e são a minha base e meu exemplo. Em especial a minha avó que em muitos dias me fez companhia durante a escrita dessa dissertação.

Ao meu orientador Alexandre Gabarra de Oliveira, por toda a ajuda e suporte necessário nesse projeto, pela sua amizade e pela oportunidade de ser sua primeira mestranda.

Agradeço também todos os envolvidos nesse projeto e ao laboratório que faço parte LABIMEF-UNESP. Agradeço também ao LICRI-UNICAMP e seus membros que me ajudaram em meus experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A obesidade, considerada uma epidemia global, está diretamente ligada a diversas patologias, incluindo síndromes metabólicas como a resistência à insulina (RI). Nesse contexto, o excesso circulante de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) ou mesmo um desequilíbrio em seu metabolismo parece estar fortemente associado com as condições de RI e obesidade. A etapa do metabolismo de BCAA, controlada pela atividade do complexo desidrogenase α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKD), pode ser considerada fator limitante, ou seja, fundamental para a manutenção dos valores circulantes de BCAA. Sua atividade é controlada pela ação da BCKD quinase (BDK) e da BCKD fosfatase (BDP), que promovem respectivamente sua inibição e ativação. Portanto, alterações da BCKD podem resultar em acúmulo de BCAA na circulação, que em troca pode promover ou agravar quadros de RI. Paralelamente, o exercício físico vem se destacando como forma de tratamento para a RI, pois induz melhora na sensibilidade à insulina sem importantes efeitos colaterais, como os observados em tratamentos farmacológicos. Porém, a maioria dos estudos enfoca apenas o componente inflamatório do efeito do exercício sobre a RI, ficando assim uma lacuna na literatura quanto ao seu papel sobre os níveis circulantes de BCAA, bem como de seu metabolismo. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do exercício físico agudo sobre o metabolismo de BCAA e sua relação com a sinalização de insulina no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica. Como resultados, o exercício físico agudo de natação resultou em melhora nas tolerâncias à glicose e à insulina, e aumento nos níveis séricos de adiponectina. Contudo, ele não foi capaz de alterar as proteínas do catabolismo de BCAA estudadas e também não conseguiu reduzir os níveis circulantes de BCAA. Assim, tomando em conjunto todos os resultados concluímos que as alterações do metabolismo de aminoácido de cadeia ramificada não participam do efeito que o exercício agudo exerce sobre a via de sinalização e sensibilidade a insulina, ao menos no que diz respeito ao tecido muscular de ratos obesos.

Palavras-chave: Resistência à Insulina; Aminoácidos de Cadeia Ramificada e Exercício Físico.

ABSTRACT

The obesity, considered a global epidemic, is linked to several diseases, including metabolic disturbance such as insulin resistance (IR). In this sense, increased levels or disturbances in metabolism of branched chain amino acids (BCAA) seem to be related to IR and obesity. The step of BCAA metabolism regulated by branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex (BCKD) is the rate limiting, i.e., essential to BCAA circulating levels maintenance. Its activity is regulated by BCKD kinase (BDK) and phosphatase (BDP), which respectively induces its inhibition and activation. Therefore, changes in BCDK activity may result in BCAA accumulation, which in turn will promote or worsen IR. In parallel, the exercise have been standing out as a treatment for IR, as it induces insulin sensitivity improvement without significant side effects, such as those normally observed in pharmacological treatments. However, most studies have focused only the inflammatory component of the effect of exercise on RI. So, there is a gap in the literature regarding the potential exercise effects on BCAA circulating levels or in its metabolism. Thus, this study aim to analyze the effects of physical exercise acute on the BCAA metabolism and its association to insulin signaling in skeletal muscle of *Wistar* rats fed on high fat diet. As a result, acute physical swimming exercise resulted in an improvement in glucose and insulin tolerances, and an increase in serum adiponectin levels. However, it was not able to alter the BCAA catabolism proteins studied and also failed to reduce circulating levels of BCAA. Taken together, all the results conclude that the alterations of BCAA metabolism do not participate in the effect that the acute exercise exerts on the signaling pathway and insulin sensitivity in the muscle of obese rats.

Key-words: Insulin Resistance; Branched Chain Amino Acids and Exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS

RI - Resistência à Insulina

BCAA - Aminoácidos de Cadeia Ramificada

BCKA - α -Cetoácidos de Cadeia Ramificada

BCATm - Enzima Aminotransferase de BCAA Mitocondrial

BCKD - Complexo Desidrogenase α -cetoácido de Cadeia Ramificada

BDK - BCKD Quinase

BDP - BCKD Fosfatase

PP2Cm - Proteína fosfatase mitocondrial 2C

APN - Adiponectina

CTL - Grupo de animais controle

DIO - Grupo de animais em dieta hiperlipídica sedentários

DIO+EXE - Grupo de animais dieta hiperlipídica submetidos ao protocolo de exercício agudo

ITT – Teste de tolerância à insulina

Kitt - A velocidade constante do decaimento da glicose

GTT - Teste de tolerância à glicose

DH - Dieta hiperlipídica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Via de catabolismo de BCAA.

Figura 2: Esquema envolvendo as variáveis do projeto.

Figura 3: Desenho experimental

Figura 4: Peso Corporal Final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE (a). Evolução semanal do peso corporal (b).

Figura 5: Teste de tolerância à glicose (GTT) ao final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE (a). E a área sobre a curva (AU), (b).

Figura 6: Teste de tolerância à Insulina (ITT) expresso pelo K_{itt} ao final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE.

Figura 7: Análise Proteica por Immunoblotting do tecido músculo, das proteínas pAKT e AKT.

Figura 8: Análise Proteica por Immunoblotting do tecido músculo, das proteínas BCATm e β actina (a). Proteínas pBCKD e BCKD (b).

Figura 9: Análise Proteica por Immunoblotting do tecido músculo, das proteínas BDK e β actina (a). Proteínas PP2Cm e β actina (b).

Figura 10: Análise Proteica por Immunoblotting do tecido músculo, das proteínas pAMPK e AMPK (a). Concentração dos níveis plasmáticos de adiponectina (b).

Figura 11: Concentração dos níveis plasmáticos de BCAA.

SUMÁRIO

Introdução	8
Objetivos	17
Materiais e Métodos	18
Resultados	26
Discussão	38
Conclusão	48
Referências Bibliográficas	49

INTRODUÇÃO

No Brasil, a obesidade e o sobrepeso vêm aumentando de forma alarmante em todas as faixas etárias, em ambos os sexos e em todos os níveis sociais. Em adultos, o excesso de peso e a obesidade atingiram, respectivamente, 56,9% e 20,8% da população brasileira em 2013, o que claramente nos deflagra a presença de uma epidemia [1]. O Ministério da Saúde, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), vem considerando a obesidade como um fator de risco para outras doenças, e procura incentivar a população a buscar um estilo de vida mais saudável por meio de propostas de alteração nas práticas alimentares e de atividade física [2].

Algumas projeções relatam que até o ano de 2030 cerca de 50% dos adultos serão obesos, ou seja, praticamente metade da população adulta mundial [3]. Ainda, sobre a prevalência atual, no mundo, estima-se que 4 bilhões de adultos estejam obesos ou acima do peso [3]. Vale ressaltar que os índices mencionados referem-se apenas aos indivíduos clinicamente classificados, ou seja, os números podem ser ainda maiores.

Segundo o conhecido levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), no conjunto das 27 cidades investigadas, a frequência de excesso de peso foi de 54,0%, sendo maior entre homens (57,3%) do que entre mulheres (51,2%). Ainda, a frequência de adultos obesos foi de 18,9%, sem qualquer diferença significativa entre os sexos. Além disso, a frequência do diagnóstico médico prévio de diabetes foi de 7,6%, também sem diferença entre os gêneros [4].

Nessa linha, a obesidade é atualmente considerada como uma epidemia global e, certamente, um dos grandes problemas de saúde pública devido à sua grande associação com morbidades como, dislipidemia, resistência à insulina (RI), diabetes tipo 2, hipertensão arterial e alguns tipos de cânceres, os quais figuram como fatores de risco relacionados às principais causas de mortalidade na população mundial [5-7]. Dentre essas morbidades associadas à obesidade, uma das mais exploradas na literatura tem sido sem a menor sombra de dúvidas a RI.

As últimas décadas revelaram que o principal elo entre a obesidade e a RI parecer ser um processo inflamatório subclínico e crônico [8, 9]. Osborn & Olefsky, 2012, analisaram através de uma revisão de literatura que a inflamação crônica do tecido adiposo associada à obesidade é um fator chave para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, e relataram vários estudos que demonstram claramente que o sistema imunológico e o metabolismo estão altamente integrados [9].

O primeiro estudo que estabeleceu o conceito de inflamação do tecido adiposo induzido pela obesidade evidenciou que a expressão de TNF- α fica aumentada em roedores obesos e que a neutralização de TNF- α resulta em importante melhora na RI [10]. Além disso, os camundongos com ausência de TNF- α , quando alimentados com dieta hiperlipídica, desenvolvem obesidade mas não RI [11]. A ativação de vias inflamatórias tem sido observada em todos os tecidos, incluindo o tecido adiposo [12, 13], fígado [14] e músculo [15], indicando que a inflamação tem um papel amplo. Nessa linha, estudos indicam que os macrófagos têm um papel central na inflamação associada à obesidade, onde o tecido adiposo de camundongos obesos e humanos está infiltrado com grande número de macrófagos [12, 13].

O músculo esquelético representa 70-80% da captação de glicose pós-prandial [16] e, portanto, a RI muscular tem um efeito profundo na intolerância à glicose e hiperglicemia na obesidade e na diabetes tipo 2. Os depósitos de gordura intramuscular estão presentes entre as fibras musculares e os macrófagos são recrutados para esses depósitos ectópicos de gordura [17]. Muitas citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, podem ser produzidas no tecido muscular (seja por miócitos ou macrófagos), e é possível, embora ainda não comprovado, que essas citocinas possam contribuir para a RI local [18].

Apesar desse cenário supra exposto, esse conceito de inflamação pode não responder pela totalidade dos quadros de RI. Em paralelo, um novo ator vem ganhando destaque desde que estudos começaram a apontar que o excesso de aminoácidos na circulação, ou ainda o desequilíbrio em seu metabolismo se mostra prevalente em condições de RI e obesidade [19, 20].

Em uma revisão da literatura, foi levantada a questão de como os níveis circulantes de BCAAs tendem a ser aumentados em indivíduos com obesidade

e estão associados com uma pior saúde metabólica e futura RI ou DM2 [21]. Este estudo descreveu dois possíveis mecanismos hipotéticos, sendo um deles que os níveis aumentados de BCAAs ativaria o complexo mTORC1, o que resultaria no desacoplamento da sinalização de insulina em um estágio inicial, podendo levar à RI e a DM2. O outro mecanismo está relacionado ao desequilíbrio do metabolismo BCAA, que poderia levar ao acúmulo de metabólitos tóxicos causando disfunção mitocondrial e apoptose associada ao DM2.

Wang e colaboradores (2011), investigaram os perfis de metabólitos sanguíneos como forma de prever a desenvolvimento de diabetes, tendo seguido 2.422 indivíduos ao longo de 12 anos, dos quais 201 desenvolveram diabetes. Nesse estudo, foram observados que cinco aminoácidos que incluíam os três de cadeia ramificada e também dois aromáticos (isoleucina, leucina, valina, tirosina e fenilalanina) apresentaram associações altamente significativas com desenvolvimento de diabetes. Estes achados evidenciam a importância do metabolismo de aminoácidos no início da patogênese da diabetes e sugerem que os perfis de aminoácidos podem ajudar, ao menos, na avaliação do risco de diabetes [20].

Ainda, estudos em humanos indicaram correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e de seus metabólitos, como seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKA), com indicadores de RI, como HOMA-IR e hemoglobina glicada [22, 23].

De forma mais específica, estudos com animais observaram que níveis aumentados de BCAA podem promover redução na sensibilidade à ação do hormônio insulina em seus tecidos alvos [24, 25]. Os BCAAs e seus metabólitos são mais fortemente associados com a RI do que muitas espécies comuns de ácidos graxos, além disso, os níveis de BCAA foram capazes de prever a incidência de diabetes em estudos com animais submetidos à dieta rica em gordura associada à suplementação de BCAA [26]. Este estudo desenvolveu um modelo para explicar como ácidos graxos e BCAA podem em conjunto promover doenças metabólicas, como a RI [26].

Os BCAA, valina, isoleucina e leucina, são considerados aminoácidos essenciais e compõem boa parte das proteínas presentes no músculo esquelético [27]. Eles, ao contrário do que geralmente acontece com a maioria dos aminoácidos essenciais, não se limitam apenas como ingrediente utilizado para a construção de proteínas, uma vez que podem atuar como sinalizadores que regulam o crescimento celular, o metabolismo de glicose e também o de lipídios [28-31]. Além de sua semelhança estrutural, esses tipos especiais de aminoácidos também compartilham etapas comuns em seu metabolismo [21, 25].

O catabolismo dos BCAA, em uma primeira etapa, é mediada pela ação da enzima aminotransferase de BCAA mitocondrial (BCATm), e participa na formação dos respectivos BCKA [32]. Animais com ausência de BCATm exibem importante melhora na sensibilidade à insulina, adiposidade e também em seu perfil lipídico [25]. A etapa seguinte de seu metabolismo é irreversível e considerada fator limitante nessa via, o que a torna fundamental para a manutenção dos valores circulantes de BCAA, bem como de seus respectivos BCKA [32, 33]. A atividade do complexo desidrogenase α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKD) é controlada pela ação da BCKD quinase (BDK) e da BCKD fosfatase (BDP), que promovem respectivamente fosforilação e desfosforilação [32, 34]. A fosforilação induzida pela BDK inibe a atividade enzimática do complexo BCKD, enquanto sua ativação é promovida quando há desfosforilação pela atividade de sua fosfatase BDP [32, 34]. Na figura 1 abaixo é exemplificada a via de catabolismo de BCAA.

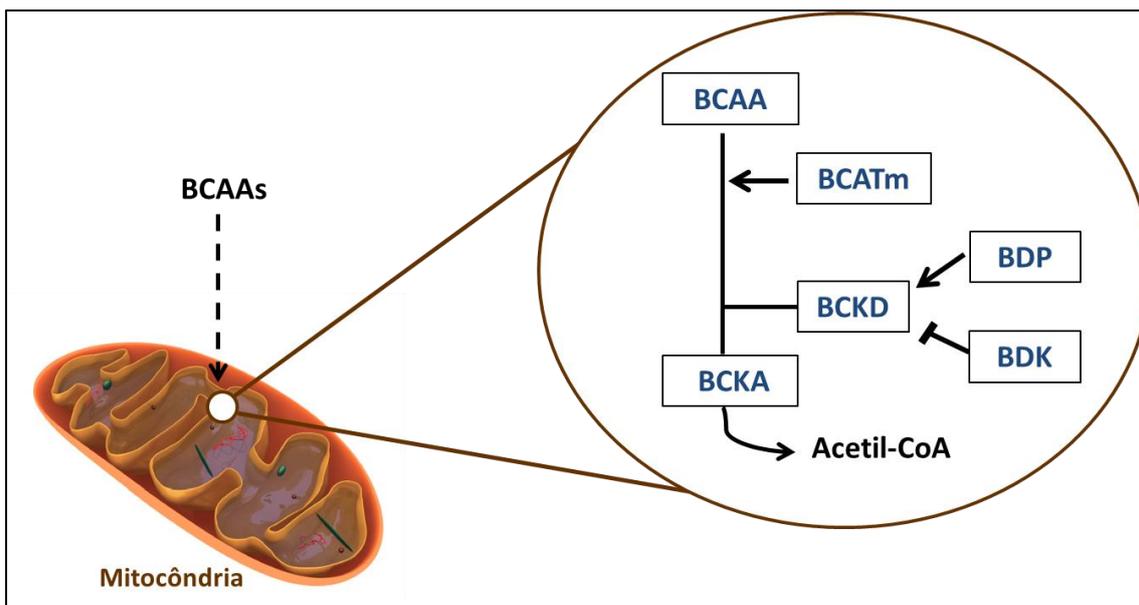


Figura 1: Via de catabolismo de BCAA. Processo de catabolismo de BCAA ocorrendo dentro da mitocôndria. A primeira etapa é mediada pela enzima BCATm, e posteriormente pelo complexo BCKD, que tem seu controle exercido pela sua fosfatase e sua quinase. Após essa segunda etapa irreversível, e passando por diversas outras reações obtém-se como resultado final o Acetil-CoA que será destinado a um próximo ciclo de Krebs.

Como a maior parte do catabolismo de BCAA ocorre nas mitocôndrias, podemos esperar uma melhor capacidade oxidativa mitocondrial no músculo esquelético em decorrência do exercício físico [35]. Por outro lado na obesidade os níveis circulantes de BCAA aumentam em decorrência das enzimas catabólicas estarem reduzidas, prejudicando a questão oxidativa [24, 36].

Alguns estudos demonstraram que, tanto em animais obesos quanto em diabéticos, há associação positiva entre aumentos nos níveis circulantes de BCAA e BCKA circulante com níveis reduzidos da atividade de BCKD em fígado e tecido adiposo [36-38]. Nesse contexto, pode-se ainda destacar que os BCKA parecem ser altamente tóxicos para as células, o que em última análise poderia resultar em disfunção mitocondrial [21]. Portanto, alterações no catabolismo de BCAA por alterações da BCTAm e/ou da BCKD, resultaria em acúmulo de BCAA e BCKA na circulação, podendo interferir no metabolismo energético, principalmente na relação entre insulina e glicose. Em especial, o fígado, tecido adiposo e músculo esquelético com suas atividades catabólicas, podem ser determinantes para a homeostase do metabolismo de BCAA [24,

39, 40]. Tendo o exercício físico aeróbio como um grande meio de afetar esses tecidos anteriormente citados, podemos inferir que este pode alterar positivamente a expressão de BCKD e/ou de BDK, resultando em um efeito positivo para o metabolismo de BCAA e conseqüentemente para via de sinalização de insulina.

Contudo, como as variações na atividade de BCKD em decorrência de alterações sofridas pelo metabolismo são apenas parcialmente influenciadas pela BDK, as supressões de BDP podem também apresentar um papel importante nesse contexto [40]. De acordo com a literatura, apenas uma BDP foi identificada, sendo essa a proteína fosfatase mitocondrial 2C (PP2Cm), que apresenta alta especificidade em induzir a desfosforilação do complexo BCKD [34]. Nessa linha, animais deficientes para PP2Cm apresentam problemas no catabolismo de BCAA, o que resulta em elevação circulante de BCAA e BCKA [34].

Adicionalmente, foi demonstrado que a PP2Cm apresenta sua expressão atenuada em camundongos diabéticos, o que pode contribuir para a redução da atividade de BCKD nesses animais [41]. Foi demonstrado ainda, que a adiponectina (APN), uma importante adipocitocina conhecida pelos seus efeitos cardioprotetores [42] e no controle do metabolismo lipídico e glicídico [43, 44], é capaz de promover a atividade dessa enzima através da ação da AMPK, uma vez que a utilização do inibidor de AMPK aboliu parcialmente o efeito da APN na expressão de BCKD [41]. Ainda, foi relatada a primeira evidência direta de que a APN é um novo regulador de PP2C e níveis sistêmicos de BCAA, sugerindo que a APN pode ser utilizada em uma abordagem farmacológica para melhorar o catabolismo BCAA no estado diabético [41]. Isso nos remete a hipótese do aumento da APN através do exercício físico poder melhorar o catabolismo de BCAA, no sentido de diminuir os níveis de BCAA circulante, evitando um cenário de aminotoxicidade.

Assim, pode ser inferido que a AMPK, além de participar da regulação do metabolismo energético [45, 46], também possui papel essencial em algumas ações da APN [47]. Esses achados complementam estudo prévio, no qual fora demonstrado que o tratamento com APN é capaz de corrigir o metabolismo alterado de BCAA no músculo esquelético em decorrência de

uma dieta rica em gordura [48]. Estudos têm associado à ativação da via de AMPK com melhora da sensibilidade à insulina em decorrência do exercício físico na obesidade [48, 49]. Diante do exposto, o exercício físico poderia promover a modulação dessa fosfatase através de um aumento da atividade de AMPK e da expressão de APN, a qual em última análise resultaria em importante redução dos níveis de BCAA e de BCKA, melhorando a disfunção mitocondrial normalmente observada na obesidade.

Paralelamente, um importante achado da literatura é o exercício físico como uma possível forma de tratamento para obesidade e para a RI, pois o mesmo melhora a sinalização e a sensibilidade à insulina sem importantes efeitos colaterais como pode ocorrer com tratamentos farmacológicos [50-52]. Um estudo com camundongos alimentados com DH e com um treinamento crônico de 6 semanas concluí que o exercício físico crônico reduz parcialmente a adiposidade, reverte a RI e diminui a inflamação do tecido adiposo nesses animais alimentados com DH [52].

Estudos mostraram esse efeito de melhora na sensibilidade à insulina, tanto em exercício crônico quanto em agudo [53, 54]. Porém, os mesmos deram enfoque principalmente sobre o efeito do exercício sobre o componente inflamatório da RI. Com isso, observamos uma lacuna na literatura quanto aos demais mecanismos pelo qual o exercício pode promover melhora na RI, como por exemplo, a redução da aminotoxicidade, que seria o excesso de aminoácidos circulantes ou ainda perturbações em seu metabolismo.

O exercício, tanto crônico como agudo, pode melhorar a função mitocondrial e promover a preservação do músculo esquelético, tendo o envolvimento das mitocôndrias como potenciais mediadores das vias de sinalização inflamatórias no músculo [55]. Ainda, o exercício físico praticado de forma regular, pode potencializar os mecanismos antioxidantes do organismo, o que pode resultar em melhora na disfunção mitocondrial associada com a obesidade e a RI, colaborando assim com a manutenção ou mesmo a recuperação da sinalização da insulina.

Porém vale a pena ressaltar que segundo dados do Vigitel, em 27 cidades, a frequência da prática de atividade física no tempo livre equivalente a 150 minutos de atividade moderada por semana foi de apenas 37,0%, sendo

maior entre homens (43,4%) do que entre mulheres (31,5%). E a frequência de adultos fisicamente inativos foi de 13,9%, sendo esse mesmo valor para ambos os sexos [4].

O músculo esquelético é o principal local de ação da insulina [56] e, conseqüentemente, se torna um alvo para intervenções terapêuticas, como o exercício, melhorando a sensibilidade insulina. O exercício é uma intervenção muito eficaz para melhorar a disfunção metabólica na obesidade [19, 57]. Tanto o exercício aeróbico quanto o de resistência foram mostrados para aumentar o potencial oxidativo aumentando a densidade mitocondrial e / ou função [35, 58]. Por outro lado, um estudo utilizando exercício aeróbico e exercício de resistência em humanos concluiu que ambos os exercícios não foram capazes de alterar o perfil de aminotoxicidade, mas somente a sensibilidade à insulina desses indivíduos [59].

Assim, tendo em vista que o exercício físico aeróbio afeta o tecido muscular esquelético, podemos inferir que este pode alterar positivamente a expressão de BCKD e/ou de BDK, resultando em um efeito positivo para o metabolismo de BCAA e conseqüentemente para via de sinalização de insulina.

Diante do exposto, o exercício físico poderia promover a modulação dessa fosfatase através de um aumento da atividade de AMPK e da expressão de APN, a qual em última análise resultaria em importante redução dos níveis de BCAA e de BCKA, melhorando a disfunção mitocondrial normalmente observada na obesidade.

Para melhor visualização de todas as variáveis descritas ao longo desta introdução, a Figura 2 procura exemplificar nossa hipótese através de um esquema à ligação das mesmas.

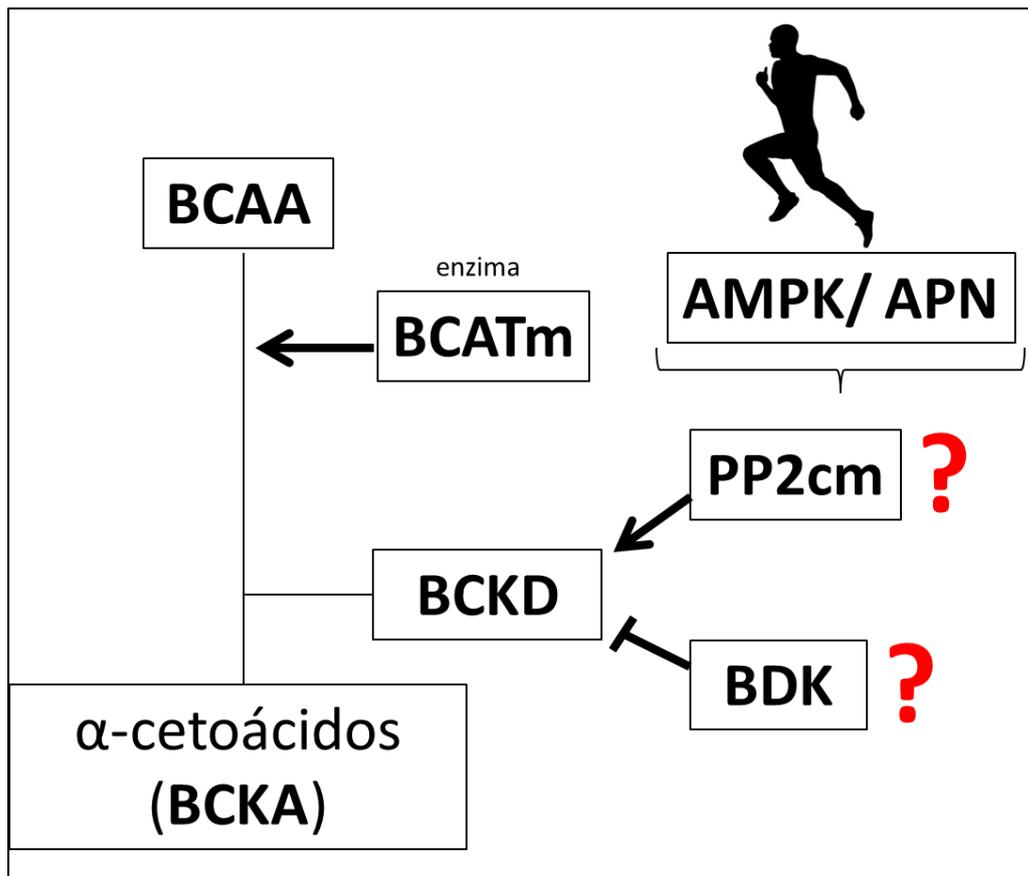


Figura 2: Esquema envolvendo as variáveis do projeto. A via resumida de catabolismo de BCAA podendo ter a influência do exercício físico através da AMPK e APN, por via a alteração das proteínas PP2c e BDK.

Diante desse *background* apresentado, que aponta para a possibilidade do exercício físico induzir redução significativa nos níveis de BCAA circulante em decorrência de alterações em seu metabolismo, num contexto de obesidade, essa dissertação de mestrado busca investigar os efeitos do exercício físico sobre o metabolismo de BCAA em animais alimentados com DH. Para tanto, buscamos, inicialmente, elucidar o papel do exercício físico agudo nas enzimas BCATm e BCKD. Num segundo momento, verificamos os desdobramentos do exercício físico sobre os reguladores da atividade da BCDK, ou seja, BDK e PP2C, bem como as possíveis associações entre essas alterações e os já conhecidos efeitos do exercício físico sobre a atividade de insulina, AMPK e expressão de APN.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Analisar os efeitos do exercício físico agudo sobre o metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada no músculo esquelético e sua relação com efeitos benéficos do exercício sobre a resistência à insulina em ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica.

Objetivos Específicos:

1- Investigar o efeito do exercício físico agudo nas enzimas responsáveis pela primeira e segunda etapa do metabolismo de BCAA (BCATm e BCKD) em músculo esquelético associados com os níveis circulatórios de BCAA, bem como sua repercussão sobre a sinalização e sensibilidade à insulina em ratos *Wistar*.

2- Investigar a modulação do exercício físico agudo sobre a fosfatase PP2C, responsável pela ativação da BCKD, em músculo esquelético, em ratos *Wistar*.

3- Investigar a modulação do exercício físico agudo sobre a expressão e atividade da quinase BDK, responsável pela inativação da BCKD, em músculo esquelético, em ratos *Wistar*.

4- Investigar a presença de associações entre os níveis de PP2C com a expressão proteica e ativação de AMPK em músculo esquelético, em ratos *Wistar*.

5- Investigar o efeito do exercício físico agudo sobre os níveis circulantes de adiponectina e BCAA.

MATERIAS E MÉTODOS

Animais e dieta

Para a realização dos experimentos do presente trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes da Seção de Biotério da UNESP Campus de Botucatu. Para este trabalho obtivemos a aprovação da Comissão de Ética no uso de animal - CEUA - IB – UNESP – CRC, sob o protocolo de número 4280.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37cm x 31cm x 16cm (cinco ratos por gaiola), e mantidos à temperatura ambiente por volta de 21° C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Ao atingirem 6 semanas de idade os animais foram inicialmente divididos aleatoriamente em 2 grupos: animais controle (CTL) e animais dieta (DIO).

O grupo CTL foi alimentado com dieta padrão para roedores (Tabela 1 e 2), durante todo o protocolo experimental. A dieta padrão utilizada foi da marca NUVILAB, da cidade de Colombo/PR-Brasil.

Já o grupo DIO foi alimentado com DH, a qual consiste de 55% das calorias provenientes de gordura, 29% de carboidrato e 16% de proteína (Tabela 3, 4 e 5). A DH foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Mario Jose Abdalla Saad, coordenador do Laboratório de Investigação clínica em resistência à insulina (LICRI) UNICAMP- Campinas, Brasil.

Após o período de 12 semanas, os animais em DH foram divididos de forma aleatória em 2 subgrupos: grupo de animais sedentários que não realizaram qualquer tipo de exercício físico (DIO) e os animais que foram submetidos ao protocolo de exercício agudo (DIO+EXE). Os animais foram mantidos em sua respectiva dieta e água ad libitum no biotério do prédio da biodinâmica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista no campus de Rio Claro.

Composição Básica da Dieta Padrão:

Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, mix de minerais (Tabela 1), mix de vitaminas (Tabela 2), biotina, cloreto de colina, lisina, metionina, aditivo BHT.

Tabela 1: Mistura de sais minerais da dieta padrão.

MIX DE MINERAIS	
Ingredientes	Quantidade
Sódio	2700 mg
Ferro	50 mg
Manganês	60 mg
Zinco	60 mg
Cobre	10 mg
Iodo	2 mg
Selênio	0,05 mg
Cobalto	1,5 mg
Fluor	60 mg
TOTAL	1 Kg

Tabela 2: Descrição das vitaminas da dieta padrão

MIX DE VITAMINAS	
Ingredientes	Quantidade
Vit A	13000 UI
Vit D3	2000 UI
Vit E	34 UI
Vit K3	3 mg
Vit B1	5 mg
Vit B2	6 mg
Vit B6	7 mg
Vit B12	22 mcg
Niacina	60 mg
Pantoten de Cálcio	21 mg
TOTAL	1 Kg

Tabela 3: Composição da dieta hiperlipídica.

DIETA HIPERLIPÍDICA	
Ingredientes	Quantidade
Banha de porco	312g
Caseína	200g
Amido Dextrinado	132g
Amido de Milho	115,5g
Sacarose	100g
Celulose Microcristalina	50g
Óleo de Soja	40ml
Mix de Minerais (Mistura)	35g
Mix de Vitaminas	10g
L-Cistina	3g
Bitartarato de Colina	2,5g
TOTAL	1 Kg

Tabela 4: Mistura de sais minerais da dieta hiperlipídica.

MIX DE MINERAIS	
Ingredientes	Quantidade
Carbonato de Cálcio Anidro	357g
Fosfato de Potássio Monobásico	196g
Citrato de Potássio Tribásico Monohidratado	70,78g
Cloreto de Sódio	74g
Sulfato de Potássio	46,6g
Óxido de Magnésio	24g
Citrato Férrico	6,06g
Carbonato de Zinco	1,65g
Carbonato Manganoso	0,63g
Carbonato Cúprico	0,3g
Iodato de Potássio	0,01g
Selenato de Sódio Anidro	0,01025g
Paramobilidato de Amônio 4H ₂ O	0,00795g
Meta-Silicato de Sódio 12H ₂ O	1,45g
Sulfato de Crômio e Potássio 12H ₂ O	0,275g
Cloreto de Lítio	0,0174g
Ácido Bórico	0,0815g
Fluoreto de Sódio	0,0635g
Carbonato de Níquel	0,0318g
Vanato de Amônio	0,0066g
Sacarose	221,026g
TOTAL	1 Kg

Tabela 5: Descrição das vitaminas da dieta hiperlipídica.

MIX DE VITAMINAS	
Ingredientes	Quantidade
Ac Nicotínico	12g
Piridoxina	2,6g
Riboflavina	2,4g
Biotina	0,06g
Manitol	9,99g
Vit A	1,6g
Vit K	0,3g
Pantotenato Cálcio	6,4g
Tiamina	2,4g
Ac Fólico	0,6g
Vit B12	0,01g
Vit E 500UI/g	60g
Vit D3	0,01g
Lactose	qsp 110g
TOTAL	110g

Após a descrição dos grupos experimentais, bem como o detalhamento da alimentação dos mesmos, segue a Figura 3 com o desenho experimental do estudo.

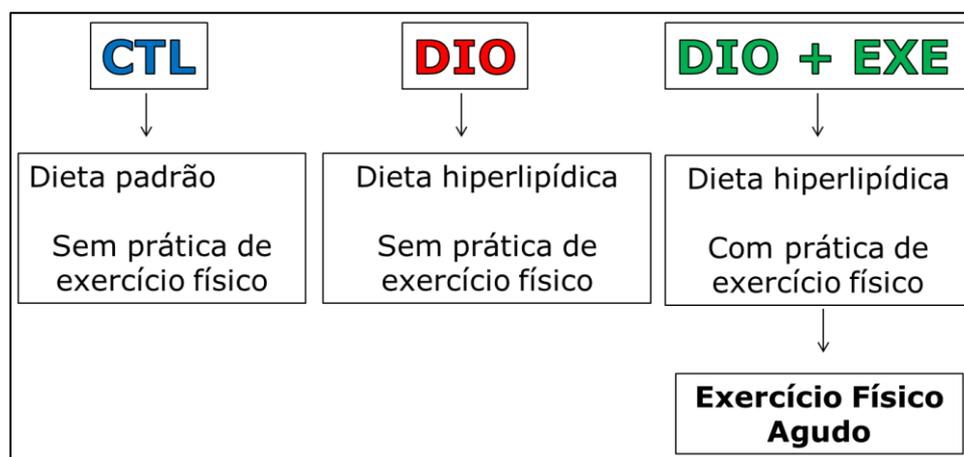


Figura 3: Desenho experimental

Protocolo de exercício físico agudo

O exercício físico utilizado neste estudo foi à natação. Para adaptação ao exercício de natação, no primeiro dia os ratos foram inseridos ao meio líquido durante 5 minutos no tanque com água rasa (sem a necessidade de

nadarem); no segundo dia, 5 minutos com água na altura da cabeça (os animais poderão nadar); no terceiro dia, 5 minutos com nível de água que exigiu que os animais nadassem; e no quarto dia eles nadaram por 15 minutos. Após a adaptação foi realizado o protocolo com os animais obesos (DIO+EXE). Em um grupo de cinco animais, nadaram em um tanque de 50 cm de diâmetro e com 100 cm de profundidade, com temperatura da água mantida em aproximadamente 34°C, por duas sessões de 3 horas, separadas por intervalo de 45 minutos. Os animais desse grupo foram sacrificados 2 horas depois do término da sessão de exercício [54, 60].

Testes de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT) e à glicose (GTT)

Os testes foram realizados 2 horas após a execução do respectivo protocolo de exercício físico agudo. O alimento foi retirado de todos os grupos antes de iniciar o exercício, para que tivessem o mesmo tempo de jejum, ou seja, cerca de 9 horas antes dos testes. A primeira coleta de sangue realizada antes do desafio equivaleu ao tempo 0 do teste. Após isso, para o ITT, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicemia utilizando-se um monitor de glicose (Glucometer; Bayer). A constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. Calcula-se o $t_{1/2}$ da glicose a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. Já o teste de tolerância a glicose intraperitoneal (GTT) foi realizado nas mesmas condições, ou seja, cerca de 9 horas de jejum. Após coletar sangue de uma amostra não desafiada (tempo 0), uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. Para determinar a concentração da glicose do soro, amostras de sangue foram coletadas da cauda em 30, 60, 90 e 120 minutos e medida utilizando-se um monitor de glicose (Glucometer; Bayer). Para a avaliação do GTT foi utilizada a média da área sob a curva de cada um dos grupos estudados.

Extração de Tecido

Esta etapa da pesquisa ocorreu após a realização dos testes ITT e GTT (todos com um intervalo de 1 semana, tempo necessário para que os animais serem considerados destreinados). Contado as 6 semanas iniciais mais as 12 semanas de dieta específica, os animais na extração do tecido muscular tinham 18 semanas de idade.

Os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/kg) intraperitonealmente e utilizados após abolição do reflexo corneano e retirada da pata à dor. A cavidade abdominal foi aberta e a veia porta exposta para injetar salina com ou sem insulina (10^{-6} M). Transcorridos 90 segundos após o estímulo, foram retirados os fragmentos de tecido músculo esquelético (gastrocnêmio) para serem colocados em um tubo com tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM ortovanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1 mg/ml aprotinina). As soluções foram homogeneizadas com Politron PTA 20S Generator, Brinkmann Instruments model PT 10/35, ajustado à velocidade máxima.

Análise Proteica por Immunoblotting

Os precipitados obtidos, após serem ressuspensos em tampão de Laemmli 107 contendo DTT 100mM e aquecidos em banho seco a temperatura de 100°C por 5 minutos, e em seguida foram submetidos a eletroforese gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o gel foi balizado por marcador de alto peso molecular da Bio Rad. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da BioRad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 60 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (stacking) e 100 volts até o final do gel de resolução (resolving). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da BioRad por 90 minutos a 120 volts. As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (solução basal com BSA 5%) por duas

horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Depois de lavadas em solução basal, estas membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos, mantidas a 4°C, overnight, sob agitação contínua. Em seguida as membranas foram novamente lavadas com solução basal e incubadas com anticorpo secundário (peroxidase) em seguida levadas por mais 3 vezes em solução basal. Por último adicionou-se a solução de quimiluminescência. As bandas foram capturadas através de aparelho fotodocumentador e foram analisadas através do programa do próprio equipamento. A partir de então foi realizada a análise dos dados, comparando-se o tecido do animal controle com o animal em dieta de maneira que sempre haverá controle intra-experimento.

Anticorpos e Reagentes

Todos os anticorpos foram provenientes das marcas: Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), CellSignaling Technology (Beverly, MA) ou ABCAM (Cambridge, MA). A tabela 6, descreve a lista de anticorpos utilizados. Os reagentes de rotina do laboratório foram comprados da Sigma Chemical (St. Louis, MO).

Tabela 6: Descrição dos anticorpos.

Anticorpo	Marca	Código	Peso molecular	Anticorpo secundário
AKT	Cell	9272	60 KDa	Rabbit
pAKT	Santa Cruz	7985	60 KDa	Rabbit
AMPK	Cell	2532	62 KDa	Rabbit
pAMPK	Cell	4185	62 KDa	Rabbit
BCATm	Santa Cruz	134964	40 KDa	Rabbit
PP2Cm	Santa Cruz	514925	41 KDa	Mouse
pBCKD	ABCAM	200577	45 KDa	Rabbit
BCKD	Santa Cruz	271538	50 KDa	Mouse
BDK	ABCAM	128935	45 KDa	Rabbit
β actina	Cell	8H10D10	43 KDa	Mouse

Coleta do sangue

Após os animais estarem anestesiados e a cavidade abdominal aberta, o sangue foi coletado da veia cava, e armazenada em microtubos de 1.0 ml. Em seguida foi colocado no gelo e posteriormente centrifugado por 20 minutos, a uma rotação de 1.100g, temperatura de 4° C, sendo separado o soro e posteriormente armazenado a -80°C até a análise através dos Kits de BCAA e Adiponectina.

Análise de BCAA

A determinação das concentrações de BCAA foi realizada através do soro, em duplicata, utilizando um kit comercial de detecção de BCAA da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA), número do catálogo-MAK003, seguindo todas as recomendações constantes no manual de instrução do fabricante.

Análise de Adiponectina

A determinação das concentrações de Adiponectina foi realizada através do soro em duplicata, utilizando um kit ELISA comercial de detecção de Adiponectina da marca Millipore, número do catálogo-EZRA DP-62K, LOT. 2459470, seguindo todas as recomendações constantes no manual de instrução do fabricante.

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, os grupos foram comparados utilizando análise de variância de um fator (ANOVA). Uma vez encontrado diferenças estatísticas significantes, foi aplicado o pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Caracterização do peso corporal e da resistência à insulina.

Ao final do protocolo experimental todos os animais tiveram seu peso corporal avaliado no intuito de verificar, primeiramente, se a DH foi eficiente em estabelecer o modelo experimental proposto, ou seja, se proporcionou significativo ganho de peso corporal e em seguida observamos o efeito do exercício agudo sobre esse importante parâmetro. Como era de se esperar, ao final de doze semanas de protocolo os dois grupos de animais alimentados com a DH apresentaram significativo ganho de peso corporal quando comparados aos seus congêneres alimentados com dieta padrão para roedores (Figura 4a). Contudo, quando comparamos apenas os animais em DH, pudemos observar que o protocolo de exercício físico agudo não foi capaz de promover qualquer redução significativa no peso corporal (Figura 4a).

Em relação à evolução de peso corporal, temos o início do protocolo acontecendo na sexta semana de vida dos animais, tendo duração de 12 semanas e conseqüentemente ao final do protocolo a idade dos animais foi de 18 semanas. Ao longo desse período, pudemos observar a proximidade dos valores dos grupos alimentados com DH e um peso inferior desses dois grupos para com o grupo controle (Figura 4b).

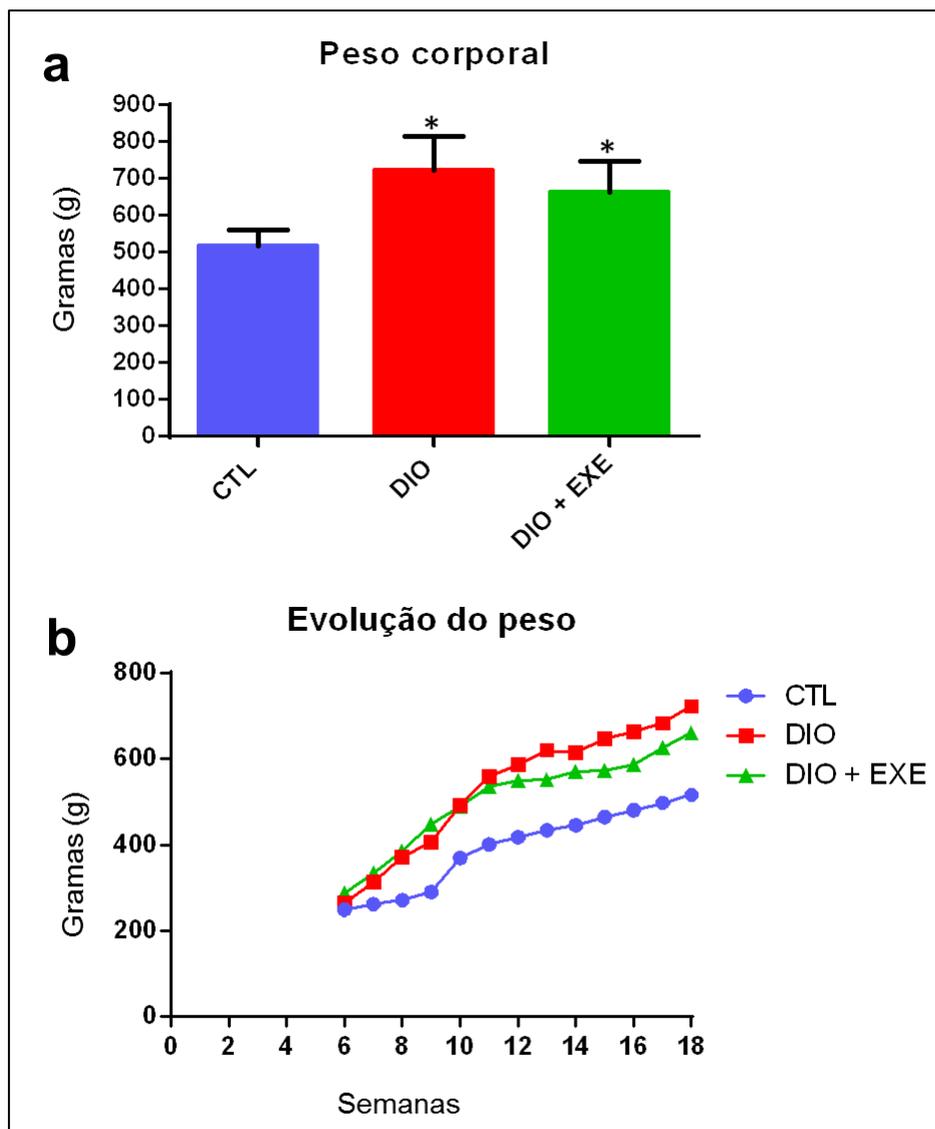


Figura 4: Peso Corporal Final. Peso corporal ao final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE (a). Evolução semanal do peso corporal em animais CTL, DIO e DIO + EXE (b). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão com n experimental de 9 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs CTL.

Após verificar o efeito da DH e do exercício físico agudo sobre o ganho de peso, o próximo passo consistiu na avaliação do efeito da DH e do exercício físico agudo sobre a resistência sistêmica à insulina. Para tanto, utilizamos os testes de tolerância à glicose e à insulina (GTT e ITT, respectivamente), que quando tomados em conjunto funcionam como medida indireta para a avaliação da RI.

Em relação ao GTT, ao final do nosso protocolo experimental pudemos observar que o grupo DIO apresentou maior intolerância à glicose quando

comparada as dos demais grupos, como evidenciado pela maior área sob a curva (Figura 5a-b). Ainda avaliando o GTT, pudemos verificar que apenas uma sessão de exercício físico de natação isolada já foi capaz de promover melhora na tolerância à glicose (Figura 5a-b). De fato se compararmos a área sob a curva do grupo exercitado com o grupo CTL veremos resultados muito similares, indicando assim a reversão da intolerância à glicose.

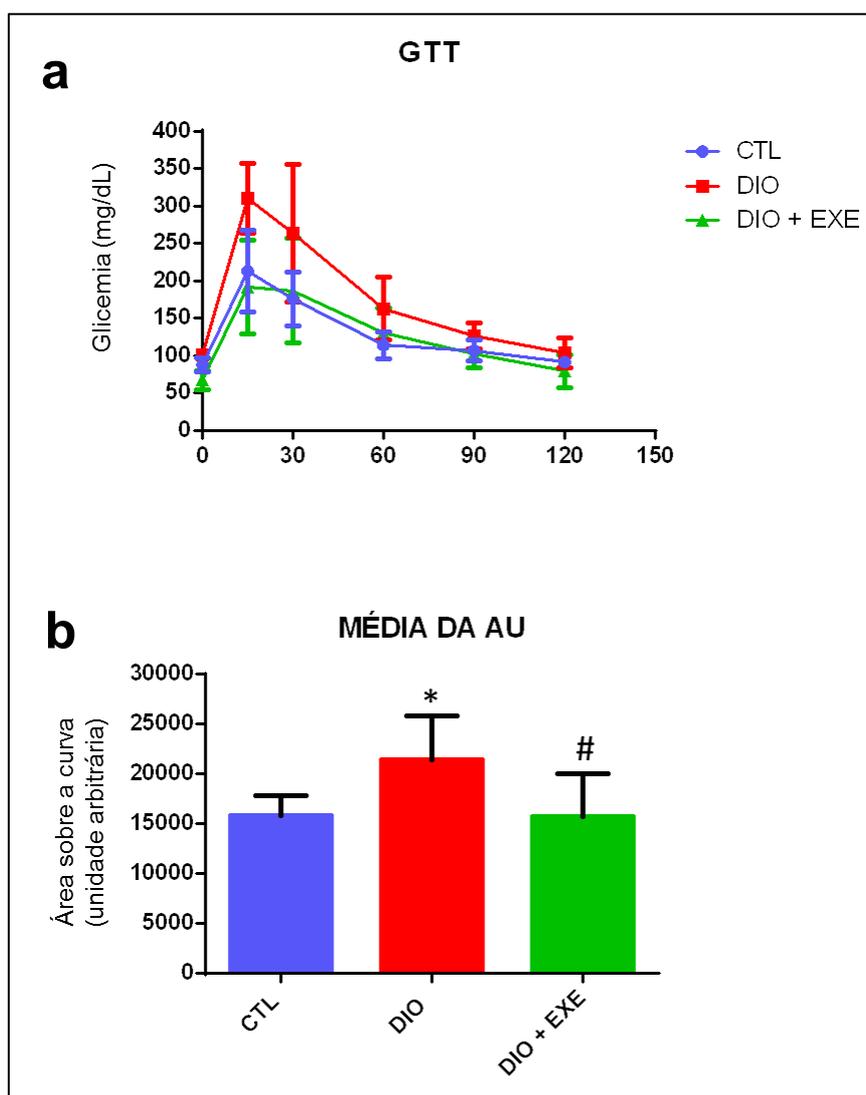


Figura 5: Teste de tolerância à glicose – Curva do GTT ao final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE (a). E sua respectiva área sob a curva (AU), (b). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 7 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs CTL e # $p < 0,05$ vs DIO.

Os resultados obtidos com o ITT, através do cálculo de sua constante de decaimento da glicose (Kitt), nos indicam que o grupo sedentário alimentado

com DH apresentou redução significativa em relação ao grupo controle, e também que o protocolo de exercício físico agudo foi capaz de reverter totalmente tal efeito deletério da DH (Figura 6). Assim, quando tomados em conjunto, os dados de GTT e ITT indicam que o exercício físico agudo promoveu importante melhora na sensibilidade à insulina nos animais obesos, podendo, portanto ser utilizado como ferramenta terapêutica para a RI. Nesse sentido, faz-se necessário investigar mais profundamente os mecanismos pelos quais o exercício agudo pode promover esse importante efeito no metabolismo de glicose.

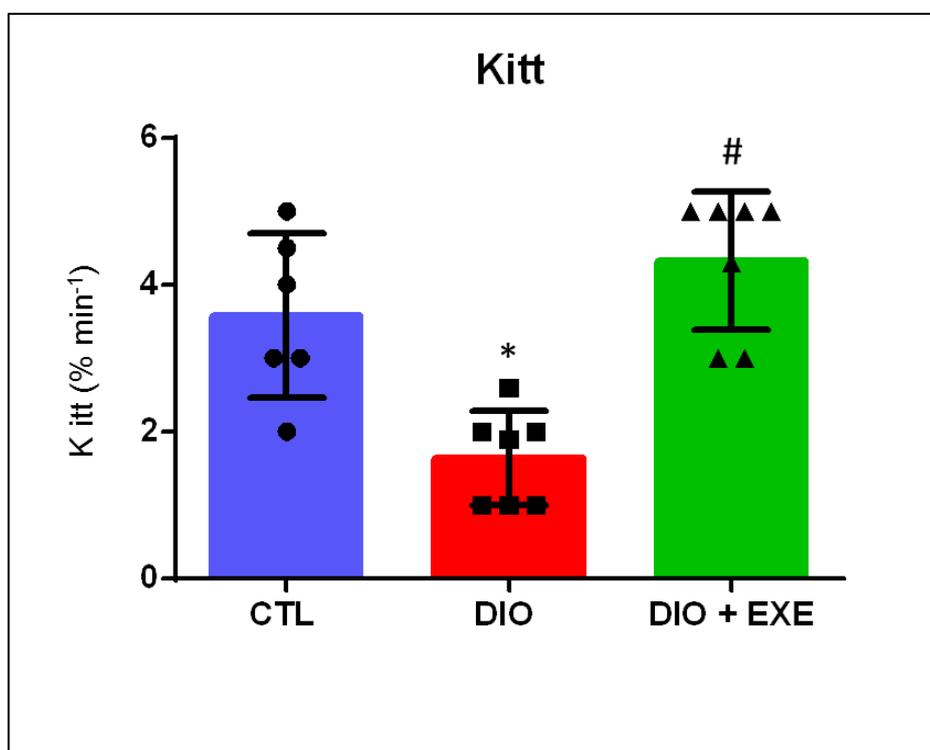


Figura 6. Teste de tolerância à Insulina. Kitt obtido através do o final do protocolo experimental em animais CTL, DIO e DIO + EXE. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 6 a 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs CTL e # $p < 0,05$ vs DIO.

Efeitos da dieta e do exercício físico agudo na sinalização de insulina.

Após observar que o exercício agudo é capaz de promover melhora na RI sistêmica, como evidenciado pelos resultados de GTT e ITT, na etapa seguinte avaliamos a repercussão na sinalização à insulina no tecido com maior capacidade de depurar a glicose sanguínea, ou seja, o muscular

esquelético. Para tanto, avaliamos a fosforilação da Akt, a última etapa da via de sinalização da insulina antes da translocação do GLUT4 nesse tecido. Como era de se esperar, os animais do grupo DIO+EXE apresentaram níveis aumentados de fosforilação da Akt em serina quando comparados aos observados no grupo de animais DIO (Figura 7). Vale a pena mencionar que não houve qualquer diferença entre todos os grupos estudados no que diz respeito à fosforilação em serina nos animais negativos, ou seja, sem estímulo com insulina (Figura 7).

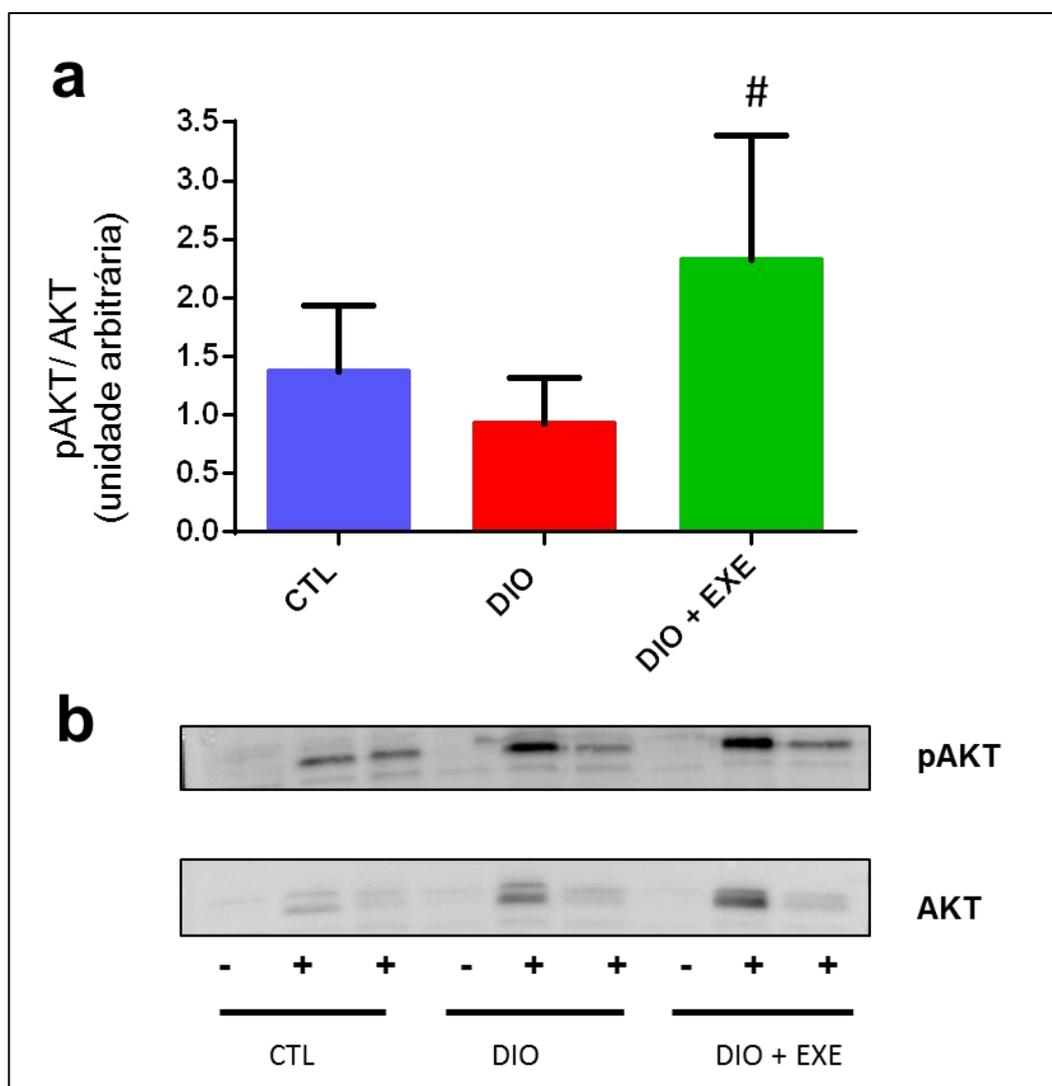


Figura 7: Efeito da DH e do exercício agudo sobre a sinalização de insulina no músculo gastrocnêmio. Respeetivo gráfico de quantificação em animais dos grupos CTL, DIO e DIO + EXE, com n experimental de 4 animais por grupo (a). Os blots representativos mostram a fosforilação da Akt em serina após estímulo com insulina (b). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. # $p < 0,05$ vs DIO. Os animais não estimulados com insulina não foram contabilizados para o cálculo das médias dos grupos

Alterações das enzimas do metabolismo de BCAA em decorrência da alimentação rica em gordura e do exercício.

Estudo anterior demonstrou que alterações nos dois primeiros passos do metabolismo de BCAA, ou seja, BCATm e BCKD, ocorrem em animais obesos, o que colabora com aumento nos níveis circulantes de BCAA [41]. Como tal estudo se deu apenas em modelos genéticos de obesidade, decidimos investigar se a DH resulta no mesmo tipo de alteração dessas enzimas em ratos, bem como os possíveis desdobramentos do exercício físico agudo de longa duração.

Em relação à expressão de BCATm, nossos resultados demonstraram que não houve alteração significativa em sua expressão nos músculo esquelético em decorrência da DH e que uma sessão aguda de natação também não foi capaz de promover qualquer alteração nessa enzima (Figura 8a).

Em seguida, avaliamos a fosforilação da enzima BCKD, que representa a atividade dessa enzima, onde quanto menor o nível de fosforilação mais ativa encontra-se essa enzima, ao passo que quanto maior for sua fosforilação menor será sua atividade. Nesse sentido, nem a DH e nem o exercício físico foram capazes de promover alteração significativa nos níveis de fosforilação e também na sua expressão quando comparados aos observados no tecido muscular do grupo CTL (Figura 8b e 8c).

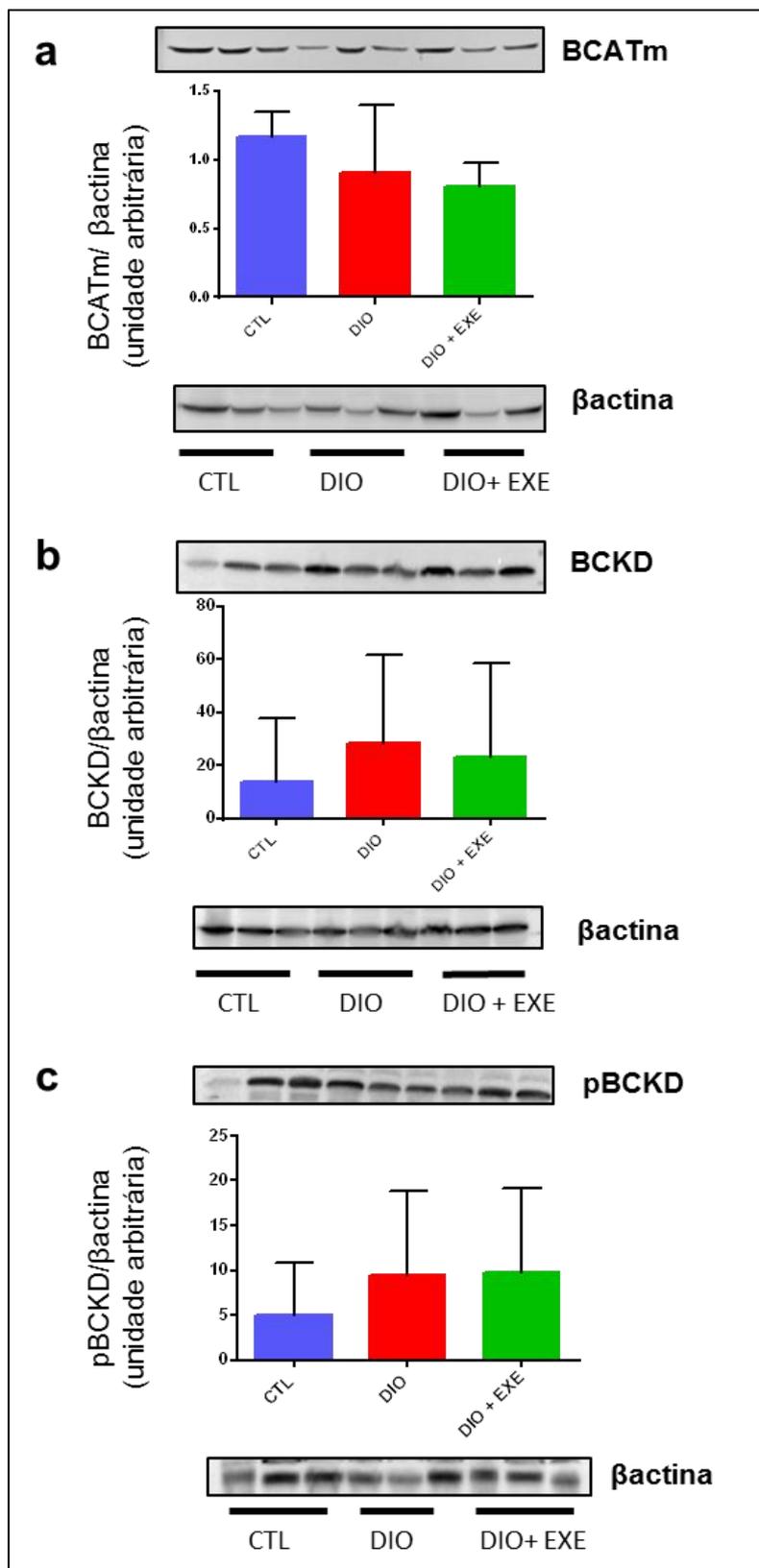


Figura 8: Alterações das enzimas do metabolismo de BCAA em decorrência da alimentação rica em gordura e do exercício. Os blots representativos demonstram a expressão de BCATm e b-actina (a) e os níveis de fosforilação e expressão de BCKD (b) em tecido muscular de animais CTL, DIO e DIO + EXE. O n experimental é de 6 animais por grupo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs CTL e # $< 0,05$ vs DIO.

A relação entre o exercício agudo e o comportamento das proteínas que controlam a BCKD

Em seguida, investigamos a interferência da DH e do exercício físico agudo na expressão BDK e PP2Cm, respectivamente inibidor e ativador da BCKD, em músculo gastrocnêmio de ratos. Em relação a quinase, nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa em sua expressão em decorrência da DH e do exercício físico (Figura 9a). Da mesma forma, os três grupos mostram resultados similares na expressão da fosfatase que ativa a BCKD (Figura 9b).

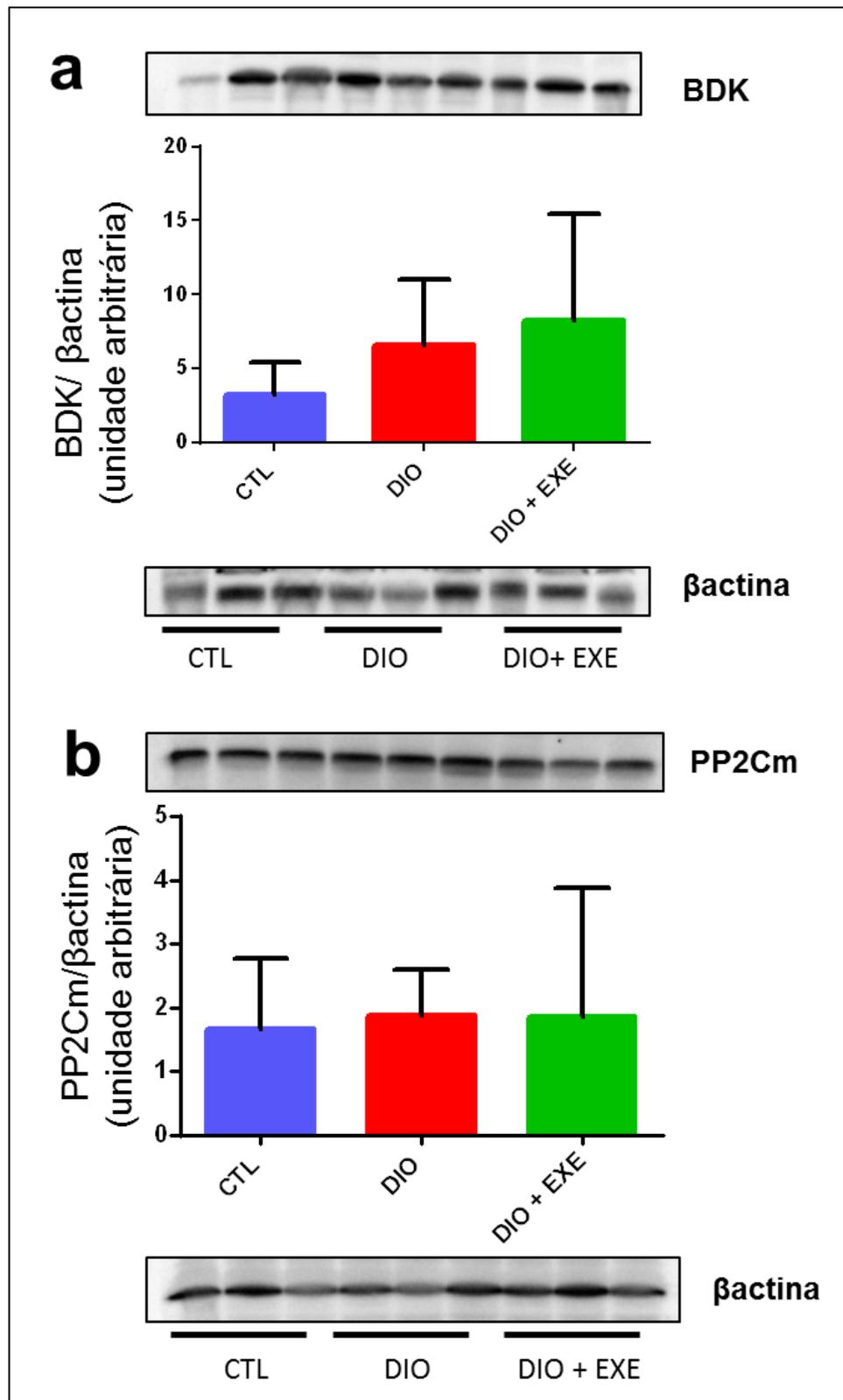


Figura 9: Exercício e DH não interferem em BDK e PP2C. (a) blots representativos demonstram a expressão de BDK, PP2C e β -actina em tecido muscular de animais CTL, DIO e DIO + EXE. (b) Quantificação dos blots. O n experimental é de 6 animais por grupo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs CTL e # $< 0,05$ vs DIO.

Efeitos do exercício agudo sobre a AMPK muscular e a adiponectina circulante.

Na etapa seguinte desse trabalho investigamos os efeitos da DH e do exercício físico agudo de natação na fosforilação e na expressão de AMPK. Os resultados mostraram uma tendência a fosforilação de AMPK em decorrência do exercício agudo, contudo nenhuma diferença significativa foi verificada entre os grupos estudados (Figura 10a). Agora, quando avaliamos a relação entre fosforilação e proteína total, o efeito do exercício se mostrou atenuado (Figura 10a). Junto a isso avaliamos as concentrações dos níveis plasmáticos de adiponectina através de ensaio de ELISA. Nossos resultados mostraram que as 12 semanas de DH resultaram em aumento significativo nos níveis de APN e que o exercício agudo não foi capaz de promover qualquer alteração nesse parâmetro (Figura 10b).

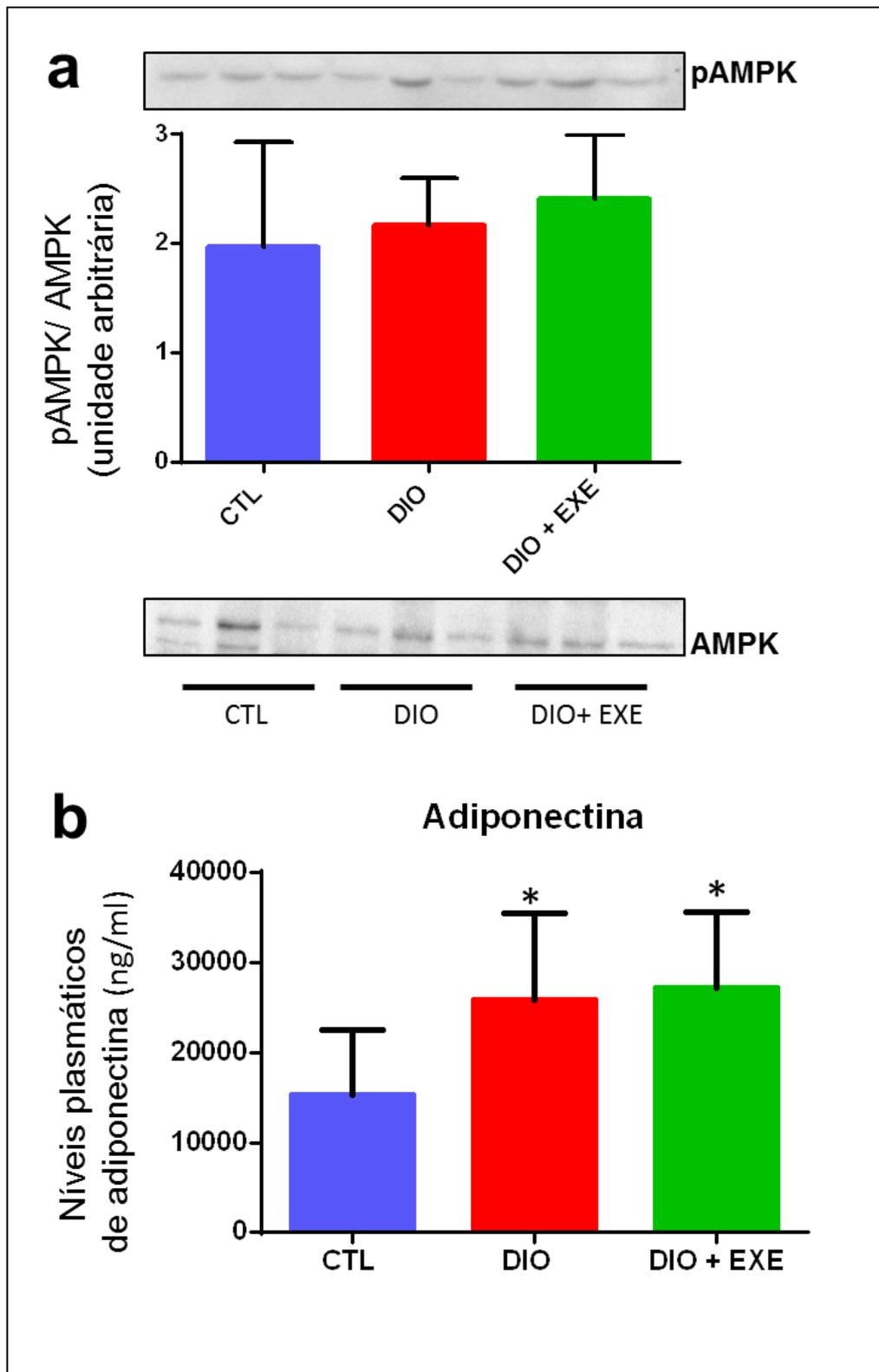


Figura 10: Efeitos do exercício agudo sobre AMPK e adiponectina. (a) Blots representativos de pAMPK e AMPK total em ratos CTL, DIO e DIO + EXE, sendo apresentados com n de 3 animais por grupo. (b) Níveis adiponectina no soro de ratos CTL, DIO e DIO+EXE com n de 10 a 13 animais por grupo. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs CTL.

Efeitos da DH e do exercício físico agudo nos níveis circulantes de BCAA

Por fim, foram verificados os níveis séricos de BCAA. Como esperado, os resultados mostraram que administração de DH por 12 semanas resultou em significativo aumento nos níveis de BCAA quando comparados aos dos animais alimentados com ração padrão para roedores (Figura 11). Por outro lado, uma sessão isolada de natação não foi capaz de atenuar esse efeito da DH, mas na verdade promoveu um aumento adicional nos níveis de BCAA, contudo esse não fora significativo (Figura 11).

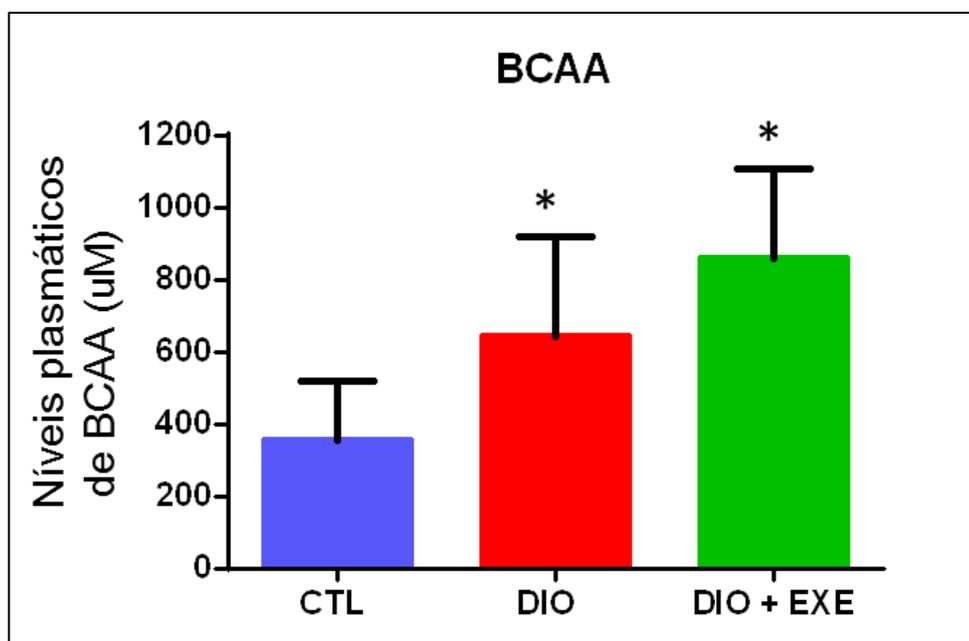


Figura 11: Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício físico agudo nos níveis de BCAA. Concentração dos níveis totais de BCAA no soro de animais CTL, DIO e DIO + EXE. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão de 9 a 12 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs CTL.

DISCUSSÃO

Em relação aos resultados apresentados na presente dissertação, podemos ressaltar que o exercício físico agudo de natação resultou em significativa melhora nas tolerâncias à glicose e à insulina, associadas com melhor na sinalização de insulina em tecido muscular, além de induzir aumento nos níveis séricos de adiponectina. Contudo, ele não foi capaz de alterar as proteínas do catabolismo de BCAA estudadas em músculo esquelético e também não conseguiu reduzir os níveis circulantes de BCAA.

Em se tratando da ausência de diferença entre o peso dos animais alimentados com DH, podemos inferir que os efeitos observados nos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e moleculares se dão em consequência única e exclusivamente como efeito do exercício físico agudo. Corroborando com tal linha de raciocínio, estudos prévios têm demonstrado que mesmo uma modesta redução no peso corporal em decorrência de dietas restritivas pode resultar em melhora do perfil metabólico ou até mesmo reverter quadros de RI [61, 62]. Além disso, a utilização de exercício físico crônico, pode resultar em alterações de composição corporal, ou seja, aumento da massa magra em detrimento dos depósitos de gordura que tornam-se reduzidos. Tal situação tornaria tentador especular que resultados metabólicos ou inflamatórios provenientes desse tipo de protocolo poderiam ser apenas uma consequência da redução dos depósitos de gordura e não um efeito do exercício físico em si, concluindo assim que ele teria efeitos indiretos apenas.

Nesse contexto, estudos demonstram que a redução no conteúdo de gordura visceral está associada a menores níveis de inflamação sistêmica, bem como de RI [54]. Ainda, nossos dados confirmam resultados anteriores obtidos em um estudo com o protocolo de exercício agudo semelhante ao nosso, apenas diferindo no momento em que as avaliações foram realizadas, no caso, 4 horas após a sessão de exercício ao invés de 2 horas utilizadas para os experimentos dessa dissertação. Nessa pesquisa em particular os autores também não observaram qualquer diferença significativa no peso corporal entre os grupos alimentados com DH, além disso, eles também avaliaram o conteúdo

de gordura epididimal mostrando também não haver qualquer diferença nesse parâmetro [54]. Vale a pena mencionar que nesse estudo esses resultados em questão serviram para validar os modelos experimentais utilizados, ou seja, que a DH induz obesidade e que o exercício físico agudo seria capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina sem qualquer alteração no peso corporal [54]. Por esses motivos supramencionados, apesar desse resultado observado no peso corporal em decorrência do exercício agudo ser esperado, ele se mostra fundamental para que o exercício físico agudo possa ser utilizado como prova de conceito para os efeitos observados no exercício crônico, uma vez que esse último, em muitos casos, pode resultar em perda de peso corporal e mais importante ainda, redução nos depósitos de gordura.

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos com o GTT e o ITT indicam que o protocolo de exercício físico agudo promoveu importante melhora na sensibilidade à insulina nos animais alimentados com DH, como evidenciado pela menor área sob a curva e maior constante de decaimento, respectivamente no GTT e ITT. Na literatura o exercício físico tem sido associado à importante melhora da homeostase da glicose e uma maior sinalização e sensibilidade à insulina após uma sessão aguda em seres humanos [63, 64] e em roedores [65, 66].

Nesse sentido, mais especificamente sobre o GTT, foi observado que a DH induziu significativa intolerância à glicose e que o protocolo de exercício agudo reverteu totalmente tal efeito indesejado da dieta rica em gordura, como evidenciado pela redução na área sob a curva observada nesse grupo. Na mesma linha, um estudo recente mostrou resultados similares em animais submetidos ao exercício crônico de natação [67]. Assim, tomando esse último estudo e também os anteriormente mencionados, podemos aqui afirmar que os resultados observados em nossos GTTs estão em acordo com a literatura.

Se avaliarmos de forma mais criteriosa os resultados obtidos no GTT de nosso estudo, podemos também avaliar a glicemia de jejum. Apesar da dieta rica em gordura promover importante intolerância à glicose, ela não foi capaz de promover qualquer hiperglicemia nos animais sedentários, assim como o protocolo de exercício agudo também não resultou em redução significativa na glicemia desses animais. Se por um lado esses resultados podem parecer

contraditórios, eles têm sido consistentemente observados na literatura [54, 67]. Um dos motivos de não termos observado incremento significativo na glicemia em decorrência da DH se dá pela escolha espécie e da linhagem escolhida, se por um lado ratos *Wistar* não apresentam hiperglicemia mesmo após 20 semanas sendo alimentados com dieta rica em gordura, por outro eles demonstram uma hiperinsulinemia bastante pronunciada, indicando grande capacidade do pâncreas desses animais em compensar a RI simplesmente aumentando a produção desse hormônio. Corroborando com essa hipótese do modelo experimental escolhido, estudos verificaram a ocorrência de hiperglicemia em decorrência de alimentação rica em gordura em camundongos, tanto em C57 quanto em Swiss [48, 68].

Já em relação ao teste ITT, assim como ocorrera para o GTT, a DH promoveu importante queda na constante de decaimento e o exercício físico agudo reverteu totalmente esse efeito. Na mesma linha, um estudo realizado com o mesmo protocolo experimental que o descrito nesta dissertação, apresentou valores de Kitt semelhantes aos apresentados nos nossos resultados [53]. Ainda, o grupo DIO também apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos experimentais [53]. Em outro trabalho mais recente, que abordou os efeitos dos exercícios físicos agudo e crônico na inflamação, fora demonstrado que tanto 8 semanas de natação, quanto uma única sessão isolada, são capazes de reverter a intolerância à insulina em decorrência de dieta rica em gordura [69]. Interessante notar que nesse estudo os animais submetidos ao protocolo de exercício agudo permaneceram cerca de 20 semanas sendo alimentados com DH e que mesmo assim tiveram seu Kitt muito similar ao observado nos animais do grupo controle, ou seja, aqueles alimentados com dieta padrão para roedores.

Além de avaliar a sensibilidade à insulina sistêmica, verificada através da análise conjunta de ITT e GTT, como se trata de um trabalho experimental, ou seja, utilizando animais, nós pudemos ainda verificar como estava a via de sinalização de insulina intramuscular. Esse parâmetro se mostra muito importante, uma vez que demonstra se ocorreu de fato a melhora nesse tecido. No presente estudo confirmamos que o protocolo agudo de natação, aplicado aos animais alimentados com DH, foi capaz de promover significativo aumento

na fosforilação Akt em resposta ao estímulo com insulina. Esse resultado também está em acordo com outros estudos prévios [54, 60]. Avaliar a Akt se mostra particularmente importante por ela ser a proteína responsável pela translocação do GLUT4 para membrana de células musculares esqueléticas [70]. Logo, se for observado um aumento na fosforilação dessa proteína em resposta a estímulos de insulina, certamente poderemos afirmar que houve sim melhor na sinalização desse hormônio. Por outro lado, quando avaliamos proteínas mais acima na via como o receptor de insulina ou ainda seu substrato, podemos não retratar a realidade, visto que um aumento na fosforilação do receptor não necessariamente garante que o restante da via irá responder da mesma maneira, e o mesmo vale para a fosforilação em tirosina de seu substrato. Por outro lado, no presente estudo não observamos diferença significativa na ativação da Akt quando comparamos os animais obesos não exercitados com seus respectivos controles. Dado esse que nos chamou alguma atenção, já que a redução na sensibilidade à insulina tinha sido observada de forma sistêmica. Uma possível explicação para tal ausência pode ter relação com a idade dos animais ao final do protocolo. Tal hipótese possui embasamento em estudos que demonstraram que, assim como humanos, ratos *Wistar* apresentam aumento moderado da adiposidade e redução da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos como consequência da idade [71, 72]. Já um estudo recente demonstrou a presença de algum processo inflamatório em tecidos periféricos como decorrência do envelhecimento e também associação dessa inflamação com redução na sensibilidade à insulina [73]. Em relação à sinalização de insulina tecidual já fora relatado redução no hipotálamo [74], tecido adiposo branco [75], tecido muscular e também hepático em decorrência do envelhecimento [76].

Nesse contexto, podemos inferir a possibilidade de apesar de não termos observado RI sistêmica, devido ao avançar da idade, o que pode estar acontecendo no músculo são processos iniciais do desenvolvimento da RI nesses animais. Por outro lado, podemos também supor que tal discrepância observada na fosforilação de Akt em animais do grupo CTL tenha como causa o n experimental relativamente baixo ou ainda problemas experimentais com o estímulo com insulina nesses animais. Dessa forma, ao nosso entender seria

interessante ou aumentar o n experimental ou ainda realizar uma nova série de experimentos com redução no tempo de tratamento com dieta hiperlipídica. Bem como verificar como está a sinalização de insulina nos outros tecidos desses animais magros, como fígado e tecido adiposo branco.

Estudos vêm demonstrando que o exercício físico ativa à via de AMPK, e que tal efeito colabora com a sensibilidade à insulina em animais obesos [48, 49]. De forma mais específica, o tecido muscular esquelético demonstra um incremento em sua captação de glicose em resposta à estímulos de insulina no período subsequente a uma sessão isolada de exercício [77, 78], e tal fenômeno parece envolver o aumento da translocação de GLUT4, que ocorre tanto em músculo com RI quanto nos com a sinalização de insulina funcionando de forma fisiológica, ou seja, saudáveis e parece, além de outros aspectos, se dar em decorrência da contração muscular [70, 79, 80]. E é justamente nessa capacidade do exercício prévio melhorar captação de glicose que a AMPK parece exercer um papel importante [81]. Como a AMPK é considerada um sensor do balanço energético, espera-se que ela tenha a sua ativação aumentada em condições de estresse, como é o caso da contração muscular, uma vez que o exercício pode promover um aumento do consumo de ATP de até 100 vezes os valores observados no repouso [82], e também de hipóxia, condições normalmente presentes na prática do exercício físico agudo [46]. Além disso, animais nocaute para AMPK parecem apresentar redução no transporte de glicose em decorrência do exercício, demonstrando assim que a ativação de AMPK é até certo ponto essencial para o efeito do exercício no metabolismo de glicose, ao menos durante a prática da atividade [83].

Reforçando essa ideia, Lee-Young, R.S e colaboradores, lançando mão de estudos *in vivo*, demonstraram que o exercício físico agudo é capaz de promover o aumento da captação glicose através de aumento da atividade da AMPK, imediatamente e depois de 3 horas [83]. Destacando a importância da ativação crônica de AMPK para o metabolismo de glicose, um estudo utilizando camundongos demonstrou que o tratamento de duas semanas com metformina melhorou a captação de glicose estimulada pela insulina de uma forma dependente de AMPK [84]. Nesse contexto, nossos resultados parecem

corroborar com esses estudos, uma vez que observamos tendência ao aumento na fosforilação da AMPK no grupo exercitado. Esse aumento da p-AMPK, certamente poderia colaborar com os efeitos que observamos na sensibilidade à insulina sistêmica em nosso estudo. Contudo, vale destacar que tal aumento não fora pronunciado como era de se esperar. Uma possível causa pode ter relação com a intensidade do exercício, uma vez que aumentos na atividade de AMPK são normalmente observados em exercícios acima de 60% do $VO_{2\text{pico}}$ [85-87]. Por outro lado, um estudo mostra que exercício de baixa intensidade até a exaustão também promove ativação de AMPK [88]. Nesse sentido, apesar de nosso protocolo de exercício agudo não ser realizado em intensidade elevada, ele possui grande volume, mas não é conduzido até a exaustão. Outra possível explicação pode estar relacionada com o tempo de coleta dos tecidos após o exercício, que no caso do presente estudo foi de 2 horas. Além disso, outra hipótese para a ausência de efeito pronunciado do exercício sobre a AMPK pode ter alguma relação com o avançar da idade. Em um estudo germinativo Reznick e colaboradores demonstraram que o processo de envelhecer estava associado com o declínio na capacidade da AMPK em responder a estímulos [89]. Nessa pesquisa os autores verificaram que animais jovens apresentavam resposta mais robusta da AMPK em decorrência do exercício físico. Diante do exposto fica clara a necessidade de mais estudos para verificar o efeito da magnitude da carga de exercício, ou seja, a relação entre intensidade e volume, e também para avaliação temporal da ativação da AMPK.

A literatura mostra que a AMPK além de interagir na regulação do metabolismo energético [45, 46], também apresenta um papel essencial em algumas ações da APN [47]. Mais especificamente, a APN regula o metabolismo celular através do eixo de sinalização AMPK/ acetil-CoA carboxilase [44] e promove inibição da inflamação pelo eixo AMPK/eNOS [90]. Além disso, vale a pena mencionar que níveis de APN e sensibilidade à insulina possuem correlação positiva. Nesse contexto, nossos resultados mostraram que os animais obesos apresentam níveis elevados de APN e que o exercício físico agudo não foi capaz de promover aumento adicional nessa adipocina. Esse aumento em decorrência da DH pode parecer contraditório

com a afirmação supramencionada, tendo em vista que os animais obesos apresentam RI, ou seja, era de se esperar que apresentassem níveis reduzidos de APN. Contudo, como a APN é uma substância secretada pelo tecido adiposo branco, não seria impossível ela aumentar em animais que apresentam grande elevação na quantidade desse tecido. Além disso, alguns dados apontam a possibilidade da existência de resistência à APN [91, 92]. De fato, um estudo demonstrou a importância da resistência a APN para RI no músculo, uma vez que o transporte de glicose em decorrência da insulina sofreu interferência máxima após o desenvolvimento da resistência à APN [91]. Levando isso em conta, podemos inferir que os animais obesos de nosso estudo possivelmente apresentem algum nível de resistência à APN e que o exercício agudo pode ter atenuado tal situação, visto que eles tem melhora significativa da RI. Tal hipótese abre caminho para novos estudos avaliarem possíveis efeitos do exercício físico na resistência à APN, bem como os mecanismos intrínsecos que permitem tais resultados.

Um estudo recente demonstrou que um mecanismo pelo qual a APN pode promover melhora na RI consiste no fato dela promover melhoras no catabolismo de BCAA no contexto da diabetes [41]. Além disso, essa pesquisa mostrou evidencia direta de que a APN pode modular a expressão de PP2Cm, desfosfatase que ativa a BCKD, através da via da AMPK [41]. Em outro estudo também foi demonstrado que o tratamento com APN é capaz de corrigir o metabolismo alterado de BCAA no músculo esquelético em decorrência de uma dieta rica em gordura [48]. Estudos demonstram níveis aumentados de BCAA e BCKA na obesidade [36, 40, 93] e que existe uma forte associação dos BCAA e seus catabólitos com a RI [94, 95]. Ainda, estudos indicam que níveis aumentados de BCAA contribuem o desenvolvimento de resistência à insulina [33, 94]. Em acordo com isso, nossos resultados mostram que 12 semanas de DH promovem significativo aumento de BCAA, associados com aumento da resistência à insulina. Como os níveis circulantes de BCAA e os seus metabolitos vêm sendo considerados na literatura como um possível prognóstico para o início de diabetes tipo 2 e intervenção na obesidade [20, 95]; estratégias que possam promover a redução dessas substancias se torna algo interessante. Assim, aventamos a hipótese de que a redução nos níveis

circulantes de BCAA poderia ocorrer em resposta do exercício físico agudo, tendo em vista que ele promove melhora na sensibilidade à insulina. Porém, ao contrário do esperado uma sessão isolada de exercício físico moderado de natação não foi capaz de reverter o aumento de BCAA em decorrência da alimentação rica em gordura. Na verdade, nossos animais exercitados apresentaram, apesar de não significativo, níveis ainda mais altos desse tipo especial de aminoácido. Esses resultados estão em acordo com a literatura, um estudo de 2015 em humanos mostrou que os níveis de BCAA são maiores em indivíduos com sobrepeso e resistentes à insulina quando comparado com magros com sensibilidade fisiológica, e o exercício não é capaz de mudar esse perfil de aminoacidemia, mas sim somente a sensibilidade à insulina [59].

Na mesma linha, animais submetidos a um protocolo agudo de exercício apresentaram níveis elevados de BCAA 3 horas após a sessão [96]. Esses níveis de BCAA aumentados após exercício agudo é bastante razoável devido ao aumento da demanda energética, uma vez que os níveis de proteólise podem contribuir com a energia do exercício, quer diretamente na oxidação, ou ainda indiretamente participando da produção hepática de glicose. Já o treinamento aeróbio poderia resultar em alguma redução dos níveis circulantes de BCAA, uma vez que esse tipo de exercício promove aumento na capacidade oxidativa das mitocôndrias. Uma das razões do treinamento físico dos estudos não ter reduzido os níveis circulantes de BCAA, como supramencionado, pode ter relação com a intensidade do exercício, ou seja, ele pode não ter sido intenso o suficiente para produzir resultados significativos na capacidade oxidativa. Assim, mais estudos se fazem necessários no intuito de delimitar os efeitos do treinamento aeróbio de diferentes intensidades sobre os níveis de BCAA.

Na obesidade os níveis circulantes de BCAA parecem aumentar em virtude da redução de suas enzimas catabólicas, o que prejudica sua oxidação [24, 36]. Como grande parte do catabolismo de BCAA ocorre nas mitocôndrias, é de se esperar que melhoras na capacidade oxidativa mitocondrial no músculo esquelético, como em decorrência do treinamento aeróbio [35, 58], possam contribuir para reduzir os níveis de BCAA circulante. Levando em consideração

que o exercício pode aumentar o tamanho e número de mitocôndrias, pode-se imaginar que ele possa interferir na expressão e atividade das enzimas do catabolismo de BCAA. Apesar dessa hipótese razoável, no que concerne ao exercício físico aeróbio agudo, ou seja, uma sessão isolada, nenhum efeito significativo foi observado. Além disso, em nossas mãos, não observamos nem ao menos redução significativa das enzimas BCAT e BCKD em tecido muscular de ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica. Tal resultado está em acordo com o atual conhecimento a respeito do papel do metabolismo de BCAA no contexto de RI/obesidade, uma vez que os estudos recentes têm apontado que um dos grandes contribuintes para esse aumento de BCAA é o tecido adiposo, uma vez que esse apresenta redução na oxidação desses aminoácidos [97]. Confirmando o papel do tecido adiposo no metabolismo de BCAA em detrimento do muscular, um estudo demonstrou que a expressão de BCKD é maior no tecido adiposo branco quando comparada a expressão no músculo gastrocnêmico, e também que o transplante com esse tipo de tecido resultou em modulação sistêmica da concentração de BCAA [24]. Além disso, tanto em roedores quanto em humanos foi observada associação da obesidade com níveis reduzidos das enzimas do catabolismo de BCAA em tecido adiposo visceral quando comparados com magros [36, 98]. Levando isso em consideração fica clara a necessidade da condução de estudos que avaliem os efeitos do exercício agudo sobre o tecido adiposo branco, no intuito de verificar o real papel do exercício sobre a atividade BCKD. Se há destaque para o tecido adiposo branco em relação à enzima BCKD, o mesmo não vale para o primeiro passo desse metabolismo que é controlado pela BCAT, enzima que é expressa principalmente no tecido muscular. Sendo assim, nos parece razoável avaliar o efeito do exercício crônico sobre sua expressão. Nessa linha, curtos períodos de jejum promovem aumento da concentração plasmática de BCAA, por promover proteólise e reduzir a síntese proteica no músculo, resultando em aumento da atividade da BCAT [99]. Por analogia podemos levantar a hipótese de o exercício físico promover o mesmo resultado, uma vez que durante sua prática temos aumento de proteólise com concomitante redução da síntese proteica. Dessa forma, estudos que avaliem a atividade enzimática em

decorrência do exercício agudo podem ser mais promissores que apenas verificar a expressão.

Além de avaliar diretamente o efeito do exercício sobre a BCKD, no presente estudo, buscamos também avaliar o efeito nos reguladores dessa enzima, ou seja, na PP2C e na BDK, que respectivamente ativam e inativam essa enzima. Vale aqui ressaltar que apesar de não termos encontrado diferença na fosforilação ou na expressão da BCKD em decorrência de exercício agudo, observar alterações de sua regulação poderia nos dar um indicio do que o treinamento seria capaz de fazer. Entretanto, assim como verificado para BCKD o exercício agudo não promoveu qualquer alteração significativa de seus reguladores no tecido muscular. Por outro lado, não fica descartado algum possível efeito do exercício crônico sobre esses parâmetros. Também, como trabalhamos com exercício agudo, ou seja, uma intervenção com efeitos limitados sobre a quantidade de uma proteína, seria também interessante verificar se o exercício agudo exerce alguma influencia sobre o RNAm, o que nos daria algum indicio de efeito agudo do exercício sobre o metabolismo de BCAA. Além disso, como já mencionado um próximo passo deverá ser a avaliação dessas enzimas no tecido adiposo branco, por ser esse o principal tecido afetado na obesidade em relação ao metabolismo de BCAA.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados no estudo podemos concluir que:

- O protocolo de exercício físico agudo não foi capaz de promover qualquer redução significativa no peso corporal.
- Os dados de ITT e GTT quando tomados em conjunto, indicam que o exercício físico agudo promoveu importante melhora na sensibilidade à insulina nos animais obesos.
- O protocolo de exercício físico agudo promoveu melhor na sensibilidade e sinalização da insulina como evidenciado, respectivamente, pelo aumento da fosforilação de Akt e pelos resultados de ITT e GTT.
- A AMPK e as proteínas que participam do metabolismo de BCAA, não apresentaram diferença estatística entre os grupos CTL, DIO e DIO + EXE.
- E a adiponectina e o BCAA circulante apresentaram uma diferença significativa tanto do grupo DIO quanto do grupo DIO + EXE, em relação ao grupo CTL.

Assim tomados em conjunto todos os resultados concluímos que as alterações do metabolismo de aminoácido de cadeia ramificada parecem não participar do efeito que o exercício agudo exerce sobre a via de sinalização e sensibilidade a insulina, ao menos no que diz respeito ao músculo esquelético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015.
2. Dias, P.C., et al., *Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro.*, in *Cadernos de saúde pública* 2017.
3. Paley, C.A. and M.I. Johnson, *Physical Activity to Reduce Systemic Inflammation Associated With Chronic Pain and Obesity: A Narrative Review.* Clin J Pain, 2016. **32**(4): p. 365-70.
4. *vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.* Ministério da Saúde, 2018.
5. Rani, V., et al., *Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies.* Life Sci, 2016. **148**: p. 183-93.
6. McNaughton, D., *'Diabesity' down under: overweight and obesity as cultural signifiers for type 2 diabetes mellitus.* Crit Public Health, 2013. **23**(3): p. 274-288.
7. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders.* Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
8. Lin, Q. and Z. Yun, *The Hypoxia-Inducible Factor Pathway in Adipocytes: The Role of HIF-2 in Adipose Inflammation and Hypertrophic Cardiomyopathy.* Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 39.
9. Osborn, O. and J.M. Olefsky, *The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease.* Nat Med, 2012. **18**(3): p. 363-74.
10. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.* Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
11. Uysal, K.T., et al., *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.* Nature, 1997. **389**(6651): p. 610-4.
12. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
13. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
14. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB.* Nat Med, 2005. **11**(2): p. 183-90.
15. Bandyopadhyay, G.K., et al., *Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle.* Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2351-9.
16. DeFronzo, R.A., et al., *The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization.* Diabetes, 1981. **30**(12): p. 1000-7.
17. Hong, E.G., et al., *Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle.* Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2525-35.
18. Saghizadeh, M., et al., *The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance.* J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1111-6.
19. Huffman, K.M., et al., *Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women.* Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1678-83.

20. Wang, T.J., et al., *Metabolite profiles and the risk of developing diabetes*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 448-53.
21. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(12): p. 723-36.
22. Fiehn, O., et al., *Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15234.
23. Badoud, F., et al., *Serum and adipose tissue amino acid homeostasis in the metabolically healthy obese*. J Proteome Res, 2014. **13**(7): p. 3455-66.
24. Herman, M.A., et al., *Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11348-56.
25. She, P., et al., *Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle*. Cell Metab, 2007. **6**(3): p. 181-94.
26. Newgard, C.B., *Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 606-14.
27. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. Block, *Branched-chain amino acid metabolism*. Annu Rev Nutr, 1984. **4**: p. 409-54.
28. Nicklin, P., et al., *Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy*. Cell, 2009. **136**(3): p. 521-34.
29. Iwanaka, N., et al., *Leucine modulates contraction- and insulin-stimulated glucose transport and upstream signaling events in rat skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(2): p. 274-82.
30. Nishimura, J., et al., *Isoleucine prevents the accumulation of tissue triglycerides and upregulates the expression of PPARalpha and uncoupling protein in diet-induced obese mice*. J Nutr, 2010. **140**(3): p. 496-500.
31. Avruch, J., et al., *Amino acid regulation of TOR complex 1*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E592-602.
32. Harris, R.A., M. Joshi, and N.H. Jeoung, *Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(2): p. 391-6.
33. Adeva, M.M., et al., *Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans*. Amino Acids, 2012. **43**(1): p. 171-81.
34. Lu, G., et al., *Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1678-87.
35. Sparks, L.M., et al., *Nine months of combined training improves ex vivo skeletal muscle metabolism in individuals with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1694-702.
36. She, P., et al., *Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(6): p. E1552-63.
37. Doisaki, M., et al., *Regulation of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase in a rat model for type 2 diabetes mellitus at different stages of the disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(2): p. 303-7.

38. Bajotto, G., et al., *Decreased enzyme activity and contents of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex subunits in a rat model for type 2 diabetes mellitus*. *Metabolism*, 2009. **58**(10): p. 1489-95.
39. Tso, S.C., et al., *Structure-based design and mechanisms of allosteric inhibitors for mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(24): p. 9728-33.
40. Adams, S.H., *Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state*. *Adv Nutr*, 2011. **2**(6): p. 445-56.
41. Lian, K., et al., *Impaired adiponectin signaling contributes to disturbed catabolism of branched-chain amino acids in diabetic mice*. *Diabetes*, 2015. **64**(1): p. 49-59.
42. Tao, L., et al., *Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress*. *Circulation*, 2007. **115**(11): p. 1408-16.
43. Turer, A.T. and P.E. Scherer, *Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications*. *Diabetologia*, 2012. **55**(9): p. 2319-26.
44. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
45. Ichihara, A. and E. Koyama, *Transaminase of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acids-alpha-ketoglutarate transaminase*. *J Biochem*, 1966. **59**(2): p. 160-9.
46. Kahn, B.B., et al., *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism*. *Cell Metab*, 2005. **1**(1): p. 15-25.
47. Lau, W.B., et al., *Systemic adiponectin malfunction as a risk factor for cardiovascular disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(7): p. 1863-73.
48. Liu, Y., et al., *Adiponectin corrects high-fat diet-induced disturbances in muscle metabolomic profile and whole-body glucose homeostasis*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 743-52.
49. Marcinko, K., et al., *The AMPK activator R419 improves exercise capacity and skeletal muscle insulin sensitivity in obese mice*. *Mol Metab*, 2015. **4**(9): p. 643-51.
50. Kasapis, C. and P.D. Thompson, *The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(10): p. 1563-9.
51. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. *J Appl Physiol* (1985), 2005. **98**(4): p. 1154-62.
52. Bradley, R.L., et al., *Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(3): p. E586-94.
53. Pauli, J.R., et al., *Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats*. *J Physiol*, 2008. **586**(2): p. 659-71.
54. Oliveira, A.G., et al., *Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats*. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. **21**(12): p. 2545-56.

55. Joseph, A.M., P.J. Adhihetty, and C. Leeuwenburgh, *Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle*. J Physiol, 2015.
56. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
57. Katzmarzyk, P.T., et al., *Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study*. Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(10): p. 1703-9.
58. Jacobs, R.A. and C. Lundby, *Mitochondria express enhanced quality as well as quantity in association with aerobic fitness across recreationally active individuals up to elite athletes*. J Appl Physiol (1985), 2013. **114**(3): p. 344-50.
59. Glynn, E.L., et al., *Impact of combined resistance and aerobic exercise training on branched-chain amino acid turnover, glycine metabolism and insulin sensitivity in overweight humans*. Diabetologia, 2015. **58**(10): p. 2324-35.
60. Luciano, E., et al., *Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway*. Eur J Endocrinol, 2002. **147**(1): p. 149-57.
61. Turner, N., et al., *Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2085-92.
62. Toledo, F.G., et al., *Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 987-94.
63. Devlin, J.T., et al., *Enhanced peripheral and splanchnic insulin sensitivity in NIDDM men after single bout of exercise*. Diabetes, 1987. **36**(4): p. 434-9.
64. Zierath, J.R., *In vitro studies of human skeletal muscle: hormonal and metabolic regulation of glucose transport*. Acta Physiol Scand Suppl, 1995. **626**: p. 1-96.
65. Richter, E.A., et al., *Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin*. J Clin Invest, 1982. **69**(4): p. 785-93.
66. H, W.-H., *Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus*. Acta Physiol Scand Suppl, 1987. **564**.
67. Zhang, G., P. Yu, and X. Liu, *Swim Training Attenuates Inflammation and Improves Insulin Sensitivity in Mice Fed with a High-Fat Diet*. Int J Endocrinol, 2017. **2017**: p. 5940732.
68. Lu, S., et al., *Reduced expression of Twist 1 is protective against insulin resistance of adipocytes and involves mitochondrial dysfunction*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12590.
69. AG, O., *EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO E CRÔNICO NA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO TLR4 EM ROEDORES.*, in 2012, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
- p. 60.
70. Hansen, P.A., et al., *Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise*. J Appl Physiol (1985), 1998. **85**(4): p. 1218-22.

71. DeFronzo, R.A., *Glucose intolerance and aging*. Diabetes Care, 1981. **4**(4): p. 493-501.
72. Facchini FS1, H.N., Abbasi F, Reaven GM., *Insulin resistance as a predictor of age-related diseases*. J Clin Endocrinol Metab., 2001.
73. Horrillo, D., et al., *Age-associated development of inflammation in Wistar rats: Effects of caloric restriction*. Arch Physiol Biochem, 2011. **117**(3): p. 140-50.
74. Garcia-San Frutos, M., et al., *Impaired central insulin response in aged Wistar rats: role of adiposity*. Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5238-47.
75. Escriva, F., et al., *In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats*. Endocrinology, 1997. **138**(1): p. 49-54.
76. Escriva, F., et al., *Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity*. J Endocrinol, 2007. **194**(1): p. 131-41.
77. Wojtaszewski, J.F., et al., *Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 325-31.
78. Pencek, R.R., et al., *Interaction of insulin and prior exercise in control of hepatic metabolism of a glucose load*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1897-903.
79. Pehmoller, C., et al., *Exercise alleviates lipid-induced insulin resistance in human skeletal muscle-signaling interaction at the level of TBC1 domain family member 4*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2743-52.
80. Castorena, C.M., et al., *Postexercise improvement in insulin-stimulated glucose uptake occurs concomitant with greater AS160 phosphorylation in muscle from normal and insulin-resistant rats*. Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2297-308.
81. Kjobsted, R., et al., *Enhanced Muscle Insulin Sensitivity After Contraction/Exercise Is Mediated by AMPK*. Diabetes, 2017. **66**(3): p. 598-612.
82. Sahlin, K., M. Tonkonogi, and K. Soderlund, *Energy supply and muscle fatigue in humans*. Acta Physiol Scand, 1998. **162**(3): p. 261-6.
83. Lee-Young, R.S., et al., *Skeletal muscle AMP-activated protein kinase is essential for the metabolic response to exercise in vivo*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 23925-34.
84. Kristensen, J.M., et al., *Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(10): p. E1099-109.
85. Chen, Z.P., et al., *Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2205-12.
86. Stephens, T.J., et al., *Progressive increase in human skeletal muscle AMPKalpha2 activity and ACC phosphorylation during exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(3): p. E688-94.
87. Wojtaszewski, J.F., et al., *Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle*. J Physiol, 2000. **528 Pt 1**: p. 221-6.
88. Wojtaszewski, J.F., et al., *Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(3): p. 309-16.

89. Reznick, R.M., et al., *Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis*. *Cell Metab*, 2007. **5**(2): p. 151-6.
90. Shibata, R., et al., *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
91. Mullen, K.L., et al., *Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **296**(2): p. R243-51.
92. Mullen, K.L., et al., *Globular adiponectin resistance develops independently of impaired insulin-stimulated glucose transport in soleus muscle from high-fat-fed rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(1): p. E83-90.
93. Xu, F., et al., *Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(6): p. E1060-5.
94. Newgard, C.B., et al., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **9**(4): p. 311-26.
95. Shah, S.H., et al., *Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss*. *Diabetologia*, 2012. **55**(2): p. 321-30.
96. de Godoy, M.R., et al., *Acute changes in blood metabolites and amino acid profile post-exercise in Foxhound dogs fed a high endurance formula*. *J Nutr Sci*, 2014. **3**: p. e33.
97. Naukkarinen, J., et al., *Characterising metabolically healthy obesity in weight-discordant monozygotic twins*. *Diabetologia*, 2014. **57**(1): p. 167-76.
98. Boulet, M.M., et al., *Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015. **309**(8): p. E736-46.
99. Holecek, M. and S. Micuda, *Amino acid concentrations and protein metabolism of two types of rat skeletal muscle in postprandial state and after brief starvation*. *Physiol Res*, 2017. **66**(6): p. 959-967.