

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

LUIZ CLAUDIO GUAZZELLI ROSA

***Sensibilidade à insulina e atividade da Akt no
músculo esquelético após sessão aguda de
exercício físico de intensidade diferente em
camundongos obesos***

Santos

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

LUIZ CLAUDIO GUAZZELLI ROSA

Sensibilidade à insulina e atividade da Akt no músculo esquelético após sessão aguda de exercício físico de intensidade diferente em camundongos obesos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Educação Física – modalidade saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

Santos

2009

LUIZ CLAUDIO GUAZZELLI ROSA

**SENSIBILIDADE À INSULINA E ATIVIDADE DA
AKT NO MÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS
SESSÃO AGUDA DE EXERCÍCIO FÍSICO DE
INTENSIDADE DIFERENTE EM
CAMUNDONGOS OBESOS**

Aprovado em 3 de dezembro de 2009



Prof. Dr. José Rodrigo Pauli - Orientador
Universidade Federal de São Paulo



Prof^a. Dra. Alessandra Medeiros
Universidade Federal de São Paulo



Prof^a. Dra. Ana Raimunda Dâmaso
Universidade Federal de São Paulo

SANTOS

2009

RESUMO

Intervenções no estilo de vida, principalmente programas de exercício físico são importantes para a prevenção da diabetes tipo 2 relacionado com a obesidade. Neste estudo, demonstramos que uma única sessão de exercício físico foi capaz de inibir a resistência à insulina em decorrência de uma dieta hiperlipídica. Foi possível demonstrar um aumento na fosforilação da proteína Akt, melhora da sinalização a insulina e redução da glicemia de jejum nos camundongos que realizaram uma hora de natação sem sobrecarga adicional (OE-1) e os camundongos que realizaram uma hora de natação com sobrecarga adicional de 5% de sua massa corporal (OE-2). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos que realizaram o exercício em diferentes intensidades. A partir dos dados obtidos, podemos inferir que o exercício físico pode auxiliar no tratamento e prevenção do diabetes tipo 2.

PALAVRAS-CHAVE

Obesidade; Diabetes; Resistência à insulina e Exercício físico.

ABSTRACT

Lifestyle interventions including exercise programmes are cornerstones in the prevention of obesity-related diabetes. In this study, we demonstrate that a single bout of exercise inhibits high-fat diet-induced insulin resistance. It was possible to show a increase in Akt serine phosphorylation, improve in insulin signaling and reduced fasting glucose in the mice that were swimming of the one hour without additional load (OE-1) and the mice that swimming one hour with 5% of the body weight (OE-2). However, there isn't significant difference between the groups that realized exercise in different intensities. From the data obtained, we can infer that exercise can help in the treatment and the prevention of type 2 diabetes.

KEY-WORDS

Obesity; Diabetes; Insulin resistance and Physical exercise.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. Epidemiologia do diabetes	02
2.2. Exercício físico e sinalização da insulina.....	02
2.3. Obesidade e resistência à insulina	04
2.4. Ação antiinflamatória do exercício físico	05
3. JUSTIFICATIVA	06
4. OBJETIVO.....	07
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	07
5.1. Caracterização dos animais.....	07
5.2. Protocolo de exercício agudo.....	08
5.3. Avaliação de parâmetros metabólicos.....	08
5.4. Determinação da glicose e insulina	08
5.5. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTIip)	09
5.6. Extração do músculo e tecido adiposo	09
5.7. Imunoblot	09
5.8. Anticorpos.....	10
5.9. Análise estatística.....	10
6. RESULTADOS	11
6.1. Parâmetros fisiológicos e metabólicos	11
6.2. O exercício físico agudo melhorou a atividade da Akt no músculo esquelético dos ratos	12
6.3. Exercício agudo aumenta a sensibilidade à insulina	13
7. DISCUSSÃO.....	14
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
9. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	17

1. INTRODUÇÃO

Em nosso corpo o músculo esquelético representa o principal tecido responsável pela captação de glicose e gasto energético. Sendo relevante para captação, liberação e estocagem de glicose (BACKER et al, 1992). A literatura demonstra que o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina e aumenta a captação de glicose pelo músculo esquelético. Recentemente, demonstrou-se também que o aumento da atividade física está associado à perda de massa corporal diminuindo em 58% o risco de desenvolver diabetes (BURN e DALE, 1924).

Em diversas condições fisiológicas, o transporte de glicose através da membrana celular é um fator limitante na utilização de glicose pelo músculo esquelético. O estilo de vida sedentário é um fator que contribui para o desenvolvimento ou aumento da resistência à insulina (BASSUK e MANSON, 2005). Estudos demonstraram que a sensibilidade à insulina pode aumentar com exercícios físicos, independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal (PAULI et al, 2008), e que o principal efeito do exercício pode ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose (GLUT-4) na musculatura esquelética (TERAN-GARCIA et al, 2005).

Interessantemente em paciente com diabetes do tipo 2, o transporte de glicose estimulado pela contração muscular se mantém sem alterações e o mesmo acontece com indivíduos obesos (KENNEDY et al, 1999). Estudo experimental mostra que o exercício físico em ratos diabéticos foi capaz de aumentar a fosforilação do receptor de insulina e da Akt, melhorando conseqüentemente a captação de glicose (AI et al, 2002). De acordo, estudos recentes mostram que o exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina e a captação de glicose tanto após uma sessão aguda de exercício como também em resposta ao treinamento físico (PAULI et al, 2008; ROPELLE et al, 2006; LUCIANO et al, 2002). Tais evidências permitem agora dizer que o exercício físico tanto agudo como crônico exerce efeitos positivos sobre a via de sinalização da insulina e captação de glicose, embora ainda não seja totalmente conhecida a melhor intensidade para esses efeitos, necessitando maiores investigações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia do diabetes

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma das principais doenças do século, com um número crescente de acometidos, afetando tanto jovem e idoso como reflexo da rápida urbanização do século XX. Esse período é acompanhado por extensas mudanças no estilo de vida populacional, como considerável redução nos níveis de atividade física associado com dietas de má qualidade e na maioria das vezes sendo hipercalóricas. (SILVA e LIMA, 2002).

Aproximadamente 90% dos DM2 apresentam excesso de gordura corporal. Vale lembrar, que 197 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam intolerância à glicose, comportamento metabólico que antecede o desenvolvimento do diabete. O diagnóstico para o futuro próximo é de aumento, e a incidência deve ser de 420 milhões até 2025 (HOSSAIN, KAWAR e EI NAHAS, 2007). Não obstante, no Brasil, o DM2 afeta um número crescente de pessoas, tornando-se um sério problema de saúde pública, sendo uma enfermidade que afeta também jovens e adultos. De acordo com o censo de 1992, a prevalência de diabetes foi de 11,6% para pessoas com idades entre 50-59 anos e de 17,4% para pessoas na faixa etária de 60-69 anos (MALERBI e FRANCO, 1992).

2.2. Exercício físico e sinalização da insulina

A insulina e o exercício físico são os estimuladores fisiologicamente mais relevantes do transporte de glicose no músculo esquelético (HAYASHI et al, 1997; GOODYEAR e KAHN, 1998). No entanto, para que sejam compreendidos os mecanismos moleculares pelo qual o exercício físico contribui para melhorar a captação de glicose, é necessário, inicialmente, descrever como a insulina transmite seu sinal celular desde o receptor até os efetores finais.

O sinal celular transmitido pela insulina, hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β do pâncreas, inicia com sua ligação a um receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR). A ativação do IR resulta na fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do

receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), respectivamente (ERIKSSON et al, 1998; FUJII et al, 2000). A fosforilação das proteínas IRSs criam sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação (HARDIE e CARLING, 1997). A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt), permitindo o transporte de glicose muscular através da translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular que, permite a entrada de glicose na célula por difusão facilitada (Figura 1).

A prática de atividades físicas regularmente promove aumento na translocação e no número desses transportadores promovendo a captação de glicose e redução da sua concentração sanguínea. Conquanto agudamente o exercício não seja capaz de aumentar a fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) e nem de aumentar a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) estimulada por insulina (HENRIKSEN, 2002), observa-se que o exercício potencializa o efeito da insulina na fosforilação do substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) com um conseqüente aumento da atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q) (HOWLETT et al, 2002). Além disso, ocorre também uma maior fosforilação em serina da proteína quinase B/Akt, proteína fundamental para iniciar a translocação do GLUT-4 para a membrana citoplasmática (WOJTASZEWSKI et al, 1999). Estudos mais recentes com ratos obesos induzidos por dieta demonstraram que o exercício agudo aumenta a fosforilação em tirosina do IR e do IRS-1, como também aumenta a associação destes substratos com a PI3q e a ativação da Akt.

Corroborando com esses achados, Luciano e colaboradores (2002) mostraram em seu estudo que o exercício de *endurance* de natação por 6 semanas com sobrecarga de 5% em relação ao peso corporal do roedor melhora a sensibilidade à insulina. Foi demonstrado ainda aumento da fosforilação do IRS-1 e IRS-2, bem como, a associação dessas proteínas com a PI3q em animais estimulados com insulina quando comparados aos animais controle.

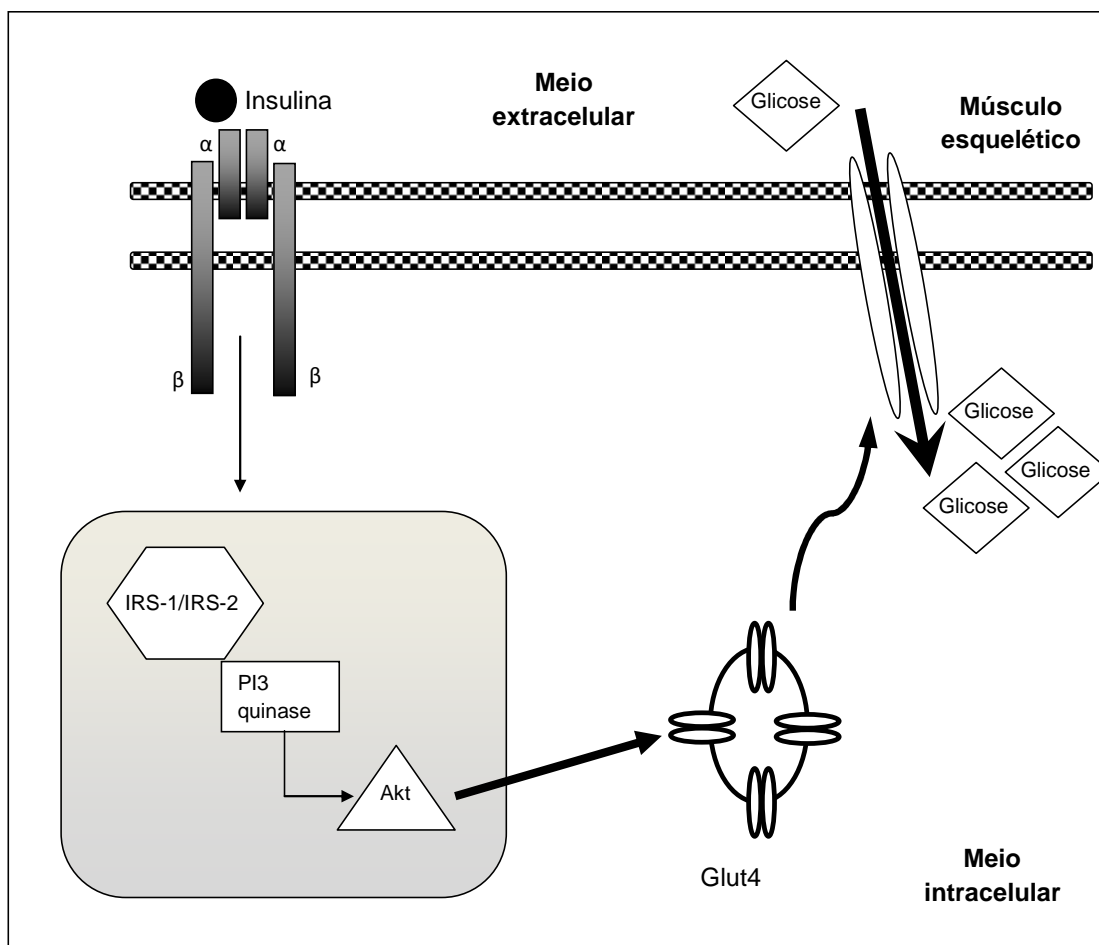


Figura 1. Via de sinalização da insulina durante a captação de glicose no músculo esquelético. A insulina, ao se ligar ao seu receptor de membrana, promove a autofosforilação da subunidade β em tirosina desencadeando uma cascata de sinalização que converge para as vesículas que contêm GLUT-4, promovendo a sua translocação para a membrana celular.

2.3. Obesidade e resistência à insulina

Somente em 1993 descobriu-se que o tecido adiposo era capaz de produzir o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), citocina inflamatória que causa resistência à insulina, surgindo à hipótese que esse tecido pode contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina. Em seguida, descobriu-se que outras citocinas inflamatórias juntamente ao TNF- α provocam resistência à insulina induzida por obesidade (WAKI e TONTONNOZ, 2007).

Essas citocinas inflamatórias junto aos ácidos graxos provenientes da ingestão de gordura ou da lipólise do tecido adiposo hipertrofiado ativam proteínas

de membrana que funcionam como mediadores da via inflamatória resultando em conseqüências negativas as ações da insulina em tecidos metabólicos. Os ácidos graxos ou tecido adiposo inflamado e infiltrado por macrófagos acionam proteínas de resposta inflamatória, incluindo a *c-jun N-terminal quinase* (JNK) e *I κ B Kinase* (IKK), que bloqueiam a ação da insulina (TSUKUMO et al, 1998).

A ativação dos substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α , como a serina quinase JNK, pode interferir na funcionalidade dos substratos do receptor de insulina o IRS-1 e IRS-2. Uma vez fosforilados em serina pela JNK compromete a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina (DANDONA, ALJADA e BANDYOPADHYAY, 2004).

Outra via pró-inflamatória, como IKK/I κ B/NF- κ B pode levar à fosforilação em serina dos substratos do receptor de insulina. Esta via pode ser ativada pelo TNF- α e também por outras citocinas pró-inflamatórias como Interleusina-1 β (IL-1 β). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo I κ B/ NF- κ B, mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs comprometendo a transdução do sinal da insulina através desta cascata (SHOELSON, LEE e YUAN, 2003; HOTAMISLIGIL, 2003).

Portanto, fica evidente que quando temos inúmeras moléculas bioquímicas provenientes dos adipócitos ou dos macrófagos na condição de obesidade, estas podem provocar a ativação de serina-quinases, especialmente a IKK e a JNK, capazes de fosforilar moléculas em serina, como o IRS-1 e IRS-2, inibindo a sinalização da insulina. Estas alterações podem explicar a resistência à insulina no músculo e no tecido adiposo.

2.4. Ação antiinflamatória do exercício físico

Estudos apontam uma forte associação entre a prática de atividade física e a redução do processo inflamatório decorrente da obesidade (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008; PETERSEN e PEDERSEN, 2005). O aumento do tecido adiposo pode resultar no quadro de resistência à insulina aumentando de duas a três vezes os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF- α . Seguindo essa forma de pensar, parece simples entender que o exercício

passa a desempenhar um papel anti-inflamatório por reduzir a gordura corporal e conseqüentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Apesar disso, estudos revelaram que o exercício físico pode reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias sem que haja alteração do peso corporal. Petersen e Pedersen estudaram os efeitos anti-inflamatórios do exercício agudo em indivíduos saudáveis (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). Outros estudos em voluntários obesos também mostraram que uma única sessão de exercício é capaz de reduzir os níveis séricos de TNF- α , sem alteração do peso corporal total desses indivíduos (FISCHER et al, 2007).

Mesmo a ação anti-inflamatória do exercício físico estando bem documentada, pouco se sabe como são produzidas as respostas anti-inflamatórias mediadas pelo exercício físico, no interior das células. Evidências experimentais e alguns trabalhos com humanos sugerem que a resposta anti-inflamatória observada no músculo esquelético após sessão aguda de exercícios, ocorre através de diferentes mecanismos. Em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura, uma única sessão de natação reduziu a fosforilação da JNK, bloqueou a via IKK/NF κ B, reduziu a fosforilação do IRS-1 em serina e restabeleceu a sensibilidade à insulina 16 horas após o término do exercício (ROPELLE et al, 2006). A sessão aguda de exercício mostrou-se eficiente na redução da fosforilação da JNK e no bloqueio da via IKK/NF κ B em seres humanos após perfusão de ácidos graxos. O bloqueio da via IKK/NF κ B também foi observada no músculo de pacientes diabéticos exercitados, impedindo que o fator de transcrição κ B (NF κ B) iniciasse a transcrição de proteínas pró-inflamatórias, dessa forma, o bloqueio desta via inflamatória através do exercício físico foi responsável por diminuir os níveis séricos de TNF- α nesses pacientes (SRIWIJITKAMOL et al, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

É reconhecido que a obesidade esta associada com resistência à insulina e diabetes. Por outro lado, o exercício físico é considerado uma ferramenta importante na prevenção dessas doenças, em especial pelo efeito na sinalização da insulina e melhora na captação de glicose no músculo esquelético. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de uma sessão aguda de exercício físico bem como qual a melhor

intensidade do exercício para o controle da resistência à insulina. Portanto, são imprescindíveis novas descobertas a cerca dos benefícios do exercício em suas diferentes intensidades para a prevenção do diabetes.

4. OBJETIVO

O objetivo do estudo é verificar a influência de uma sessão aguda em diferentes intensidades de exercício físico na sensibilidade à insulina e atividade da Akt no músculo esquelético de camundongos Swiss diabéticos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização dos animais

Foram utilizados vinte e quatro (n=24) camundongos Swiss com seis semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina - UNESC, Criciúma - SC. Os animais foram alocados, na mesma instituição, em gaiolas individuais e receberam água e dois tipos de dieta: ração padrão para roedores (C) ou dieta hiperlipídica (DHL) durante o período experimental, *ad libitum* (detalhes da dieta, ver referência PAULI et al, 2008). Os camundongos foram expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro e mantidos a temperatura de 20°C e 22°C. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro subgrupos: grupo controle (n=6) que recebeu dieta padrão (C); grupo obeso sedentário (n=6) que recebeu DHL por 12 semanas (OS); grupo obeso (n=6) que recebeu DHL por 12 semanas e foi submetido ao exercício agudo sem sobrecarga adicional ao peso corporal (OE-1); e grupo obeso (n=6) que também recebeu a DHL por 12 semanas e foi submetido ao exercício agudo com sobrecarga correspondente a 5% do peso corporal do animal (OE-2). Todos os experimentos a seguir relatados foram realizados no laboratório de fisiologia e bioquímica, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, em Criciúma/SC. Para acompanhamento dos estágios de treinamento e aprendizado das técnicas utilizadas e a seguir descritas, foram feitas visitas ao laboratório de sinalização celular situado na Faculdade de Ciências

Médicas da Unicamp-Campinas. Além disso, as amostras do músculo gastrocnêmio foram utilizadas e processadas como descritas no material e método no mesmo laboratório de sinalização celular previamente descrito.

5.2. Protocolo de exercício agudo

O protocolo de exercício físico agudo consistiu de natação, em grupos de seis animais, e foi realizado em tanques cilíndricos de diâmetro interno de 60 cm e 100 cm de profundidade, com temperatura da água em 34 ± 1 °C. Os animais realizaram uma única sessão de exercício de 1 hora, sem sobrecarga adicional para o grupo OE-1 e com sobrecarga adicional equivalente a 5% do peso corporal para o grupo OE-2, presa a cauda do animal. Porém, antes da realização do exercício, os camundongos foram previamente adaptados ao meio líquido. Isso é feito inserindo os animais por três dias no local de natação com água na altura do tórax dos mesmos. Isso também foi feito para os outros grupos, simulando o estresse recebido pelo grupo OE-1 e OE-2.

5.3. Avaliação de parâmetros metabólicos

Os animais foram avaliados quanto à massa corporal, níveis séricos de glicose e insulina no final do período experimental. Cinco animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização de teste de tolerância à insulina uma semana antes do final do experimento.

5.4. Determinação da glicose e insulina

A dosagem da glicose plasmática foi realizada através do método enzimático colorimétrico de glicose oxidase. A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada pelo método ELISA.

5.5. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTIip)

O teste foi realizado 16 horas após a sessão de exercício de natação. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivaleu ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (2U/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 glicose sérica. A velocidade constante do decremento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

5.6. Extração do músculo e tecido adiposo

Os camundongos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg). A perda dos reflexos pedal e da córnea foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e após localização da veia porta 0,2 ml de salina ou insulina (10^{-6} mol/l) foram injetadas. Amostras do músculo gastrocnêmio foram retiradas após 90 s da injeção de insulina, e foram homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoprecipitação com anticorpo específico. Ao final dos procedimentos experimentais o tecido adiposo epididimal foi retirado para pesagem em balança analítica.

5.7. Immunoblot

Após determinação da concentração das proteínas foi aplicada a técnica de immunoblot e o uso de anticorpos específicos. De início as amostras após rápida

fervura foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com anticorpo específico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O método de identificação utilizado foi a quimioluminescência que consiste de: as proteínas são transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad, Hercules/CA, USA), onde as proteínas de interesse são detectadas incubando-se as membranas com anticorpos primários, seguindo-se a exposição com anticorpos secundários conjugados com a horseradish peroxidase (HRP). As bandas imunorreativas são detectadas por quimioluminescência e a densitometria determinada por meio de sistema de captação e análise de imagem.

5.8. Anticorpos

Os anticorpos utilizados para o imunoblot foram anti-Akt e anti-phosphoserina Akt (Ser473) ambas da Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

5.9. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. Quando comparado dois grupos, foi utilizado teste t de Student para dados não pareados. Quando necessário utilizou-se análise de variância, seguida de teste post hoc de Bonferroni para comparação múltipla de médias, sendo adotado o nível de significância $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros fisiológicos e metabólicos

A tabela 1 compara os dados dos camundongos do grupo controle (C), dos camundongos obesos sedentários (OS), dos camundongos agudamente exercitados sem sobrecarga adicional (OE-1) e dos camundongos obesos submetidos ao exercício agudo com sobrecarga adicional (OE-2). Observa-se que a massa corporal dos animais dos grupos OS, OE-1 e OE-2 foram significativamente superiores em relação ao grupo controle. Entretanto não houve diferença entre estes grupos (OS, OE-1 e OE- 2).

Em relação ao conteúdo de gordura epididimal, os resultados foram bastante semelhantes aos encontrados quanto à massa corporal. Os roedores pertencentes aos grupos OS, OE-1 e OE-2 apresentaram gordura epididimal significativamente superior em relação ao grupo controle, não havendo diferenças entre estes grupos.

Quanto à glicemia de jejum, os resultados mostram que os animais OS, OE-1 e OE-2 tiveram valores de glicose significativamente superiores em relação ao grupo controle. Por outro lado, satisfatoriamente, os camundongos OE-1 e OE-2 apresentaram concentração de glicose no sangue inferior ao grupo OS. No entanto não houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao exercício agudo, não havendo interferência da intensidade de exercício para esse parâmetro. Por fim, os valores de insulinemia foram significativamente maiores nos ratos OS, OE-1 e OE-2 quando comparados ao grupo controle. Não foram encontradas outras diferenças significativas na comparação entre os demais grupos.

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos e metabólicos

Grupos/Parâmetros	Peso Corporal (gramas)	Gordura Epididimal (gramas)	Glicemia Jejum (mg/dl ¹)	Insulina Jejum (ng/ml ¹)
C (n=6)	28.4 ± 1.88	0.6 ± 0.10	95.6 ± 3.96	2.9 ± 0.62
OS (n=6)	51.4 ± 3.12*	2.9 ± 0.16*	306 ± 26.60*	8.8 ± 0.62*
OE-1 (n=6)	53.6 ± 2.88*	3.1 ± 0.12*	186 ± 21.40*#	9.0 ± 0.62*
OE-2 (n=6)	56.2 ± 3.33*	3.1 ± 0.21*	152 ± 31.50*#	8.9 ± 0.62*

*p<0,05, controle (C) versus OS, OE-1 e OE-2; #p<0,05, OS versus OE-1 e OE-2.

6.2. O exercício físico agudo melhorou a atividade da Akt no músculo esquelético dos ratos

Na figura 2, esta representada a fosforilação da Akt induzida por salina e insulina entre os grupos estudados. Houve aumento na fosforilação da Akt nos camundongos controles, OS, OE-1 e OE-2 quando estimulado por insulina em relação ao grupo controle salina. Nos camundongos OS, a fosforilação da Akt foi reduzida após injeção de insulina em 2.3 vezes, quando comparado com os camundongos controles. Já nos animais OE-1 e OE-2, a fosforilação da Akt aumentou em 2.0 e 2.1 vezes comparado aos animais OS, respectivamente. Não houve diferença estatística na fosforilação da Akt entre os grupos OE-1 e OE-2. Entretanto, não houve diferença significativa na expressão da Akt entre os grupos estudados (figura 2, conteúdo abaixo do gráfico).

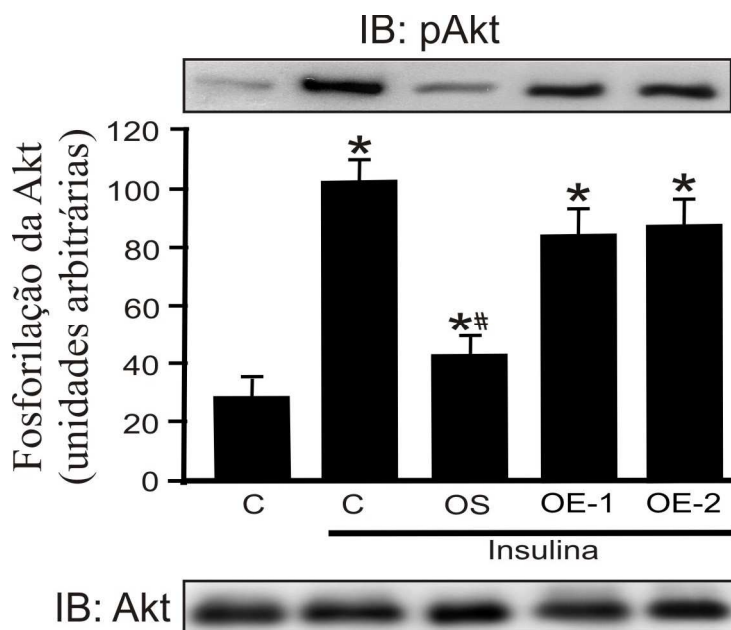


Figura 2. Sinalização da Insulina no tecido muscular. Após injeção de salina e de insulina nos camundongos os tecidos musculares foram retirados. A amostra de tecido foi imunoblutada (IB) com anticorpos anti-phospho Akt e anti-Akt. * $p < 0,05$, camundongos controle (C) injeção de salina *versus* camundongos controle (C), Camundongos Obesos Sedentários (OS), Camundongos Obesos que realizaram exercício sem sobrecarga (OE-1) e Camundongos Obesos que realizaram exercício com sobrecarga de 5% da massa corporal total (OE-2) com injeção de insulina. # $p < 0,05$, Camundongos Obesos Sedentários (OS) *versus* Camundongos Controle (C) injeção de insulina, Camundongos Obesos que realizaram exercício sem sobrecarga (OE-1) e Camundongos Obesos que realizaram exercício com sobrecarga de 5% da massa corporal total com injeção de insulina (OE-2).

6.3. Exercício agudo aumenta a sensibilidade à insulina

Na figura 3, são apresentados os resultados sobre a captação de glicose durante o teste de tolerância à insulina (TTI) dos grupos estudados. Observa-se que os camundongos obesos tiveram redução significativa na captação de glicose em relação ao grupo controle. Por outro lado, os animais exercitados tiveram aumento significativo na taxa de consumo de glicose quando comparados aos animais sedentários, sendo os valores não diferentes do grupo controle. Tais resultados mostram que uma única sessão de exercício é capaz de melhorar a captação de glicose em camundongos obesos. Os valores para os respectivos grupos foram: C, 5.0 ± 0.49 ; OS, 1.78 ± 0.68 ; OE-1, 3.98 ± 0.45 ; OE-2, 4.33 ± 0.72 .

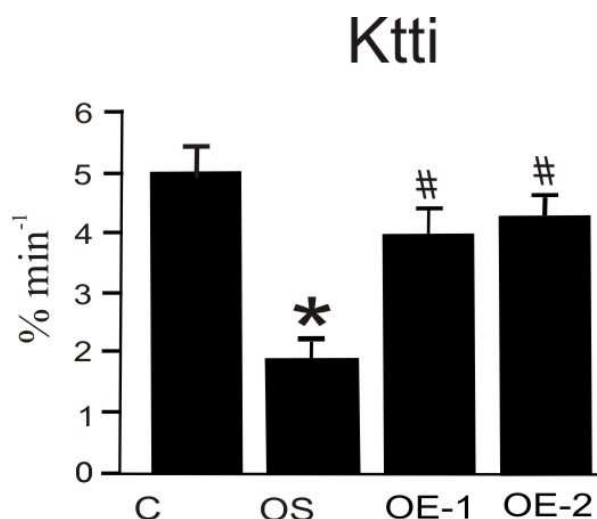


Figura 3. Teste de Tolerância à insulina (Kitt) dos diferentes grupos estudados. * $p < 0,05$, camundongos obesos sedentários (OS) *versus* Camundongos controles (C); # $p < 0,05$, Camundongos exercitados (OE-1 e OE-2) *versus* Camundongos obeso sedentário (OS).

7. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que o sedentarismo leva a um aumento de massa corporal, junto a um elevado acréscimo de tecido adiposo (ALMÉRAS et al., 1997; APPLGATE e STERN 1987; WALBERG et al., 1983; ECKEL e YOST, 1987). Sabe-se que este fato pode provocar resistência à insulina, sobrecarregando a função da célula beta pancreática, podendo causar diabetes tipo 2.

Em contra partida, existem estudos demonstrando que a sensibilidade à insulina é melhorada com a prática de exercícios físicos, tanto crônico quanto agudo, mesmo não havendo redução da massa corporal total. Porém, ao cessar essa prática, tais efeitos são rapidamente interrompidos (HOUMARD et al., 1993; ARCIERO, SMITH e CALLES-ESCADON, 1998). Em nosso estudo, não encontramos diferença na massa corporal e no conteúdo de gordura epididimal, o que era esperado uma vez que houve apenas uma sessão de exercício.

Luciano e colaboradores demonstram que a sensibilidade à insulina aumenta no músculo esquelético de ratos normais e nos adipócitos com a prática de exercício físico de 6 semanas com sobrecarga de 5% em relação ao peso corporal dos animais através da via IRSs/PI 3-quinase/Akt (LUCIANO et al, 2002).

Estudos comprovam que o tecido adiposo é capaz de produzir TNF- α , a citocina pró-inflamatória capaz de gerar resistência à insulina. (KERN, 1995; WAKI e TONTONOZ, 2007). Em confronto a essa informação, pode-se afirmar que o exercício físico quando realizado periodicamente, diminui os níveis de insulina no plasma e aumenta a expressão de GLUT-4 no músculo, resultando na diminuição da resistência a insulina (HARDMAN, 1996). Fato este comprovado por outros estudos que demonstram que a captação muscular de glicose está aumentada durante o exercício por vias não dependente de insulina envolvendo a translocação de GLUT-4 (KENNEDY et al, 1999; TAGUCHI et al, 2000). Sendo este, um efeito que pode perdurar mesmo após a prática de exercício físico melhorando o controle glicêmico em longo prazo (MERCURI e ARRECHEA, 2001).

Tal aumento na sensibilidade á insulina de músculos em humanos fisicamente treinados desaparece rapidamente (2 a 3 dias) uma vez cessado o exercício, sugerindo que em grande parte os efeitos estão relacionados à última sessão de atividade física (HOLLOSZY, 2005). Pensando nessa hipótese, nosso estudo investigou se apenas uma sessão de exercício físico é capaz de diminuir a resistência à insulina e se a intensidade com a qual o exercício físico foi realizado também gera comportamentos distintos nessa via.

A obesidade esta relacionada à resistência a insulina e hiperglicemia. De acordo com o estudo de Ropelle e colaboradores duas sessões de 3 horas de exercício com 45min de intervalo entre elas para recuperação, foram suficiente para promover a melhora na sensibilidade da insulina (ROPELLE et al, 2008). Por outro lado, em nosso estudo constatou-se que apenas uma sessão de uma hora de exercício físico foi capaz de reduzir a concentração de glicose no plasma quando comparados ao grupo controle e ao grupo obeso sedentário, porém não houve diferenças significativas na concentração de glicose nos grupos que praticaram exercícios físicos em diferentes intensidades.

Outro dado bem documentado refere-se ao efeito da obesidade em gerar resistência à insulina alterando a cascata de sinalização desta via, ocasionando uma menor fosforilação e ativação da Akt (PAULI et al, 2008; ROPELLE et al, 2006). Os resultados desta pesquisa estão de acordo com estes estudos citados.

Neste estudo, também foi possível verificar que uma sessão de exercício físico foi capaz de aumentar a fosforilação da proteína serina treonina quinase (Akt), melhorando a sensibilidade à insulina.

Outros autores, evidenciam que o efeito do exercício físico agudo em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) consiste num notável aumento na utilização de glicose se comparado com indivíduos diabéticos tipo 2 não treinados. Desta forma, fica clara a importância do exercício físico para indivíduos com DM2, tratados ou não com insulina, como resposta do seu efeito agudo (LEONG e WILDING, 1999; GUMBINER, 1999; DELA et al, 1999; HICKNER et al, 1999).

O treinamento físico promove redução da glicemia de jejum. Isso pode ser justificado pelo efeito benéfico do exercício físico, assim como a melhora da captação de glicose que se encontra aumentada durante a prática do exercício físico, mesmo o praticante estando com baixos níveis insulinêmicos (LUCIANO e BESSA LIMA, 1997). Pratley e colaboradores, estudaram pessoas com mais de 65 anos de idade durante a realização de exercícios físicos aeróbios por 9 meses e, demonstraram que esse tipo de treinamento diminuiu significativamente as concentrações de insulina estimuladas pela glicose, demonstrando aumento na sensibilidade da insulina (PRATLEY et al, 2000). Zinker e colaboradores em sua pesquisa com três grupos de indivíduos diabéticos, onde o primeiro grupo fez exercícios físicos, o segundo grupo usou metformina e o terceiro grupo usou troglitazone; identificou que o grupo que mais melhorou a sensibilidade à insulina foi o que fez exercícios físicos (ZINKER, 1999).

Embora não investigado em nosso estudo, é possível que uma sessão única de exercício físico tenha reduzido a expressão de proteínas inflamatórias de efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina, como a JNK e IKK. Assim não havendo modificações nos níveis insulinêmicos e na massa corporal e de tecido adiposo, o exercício agudo é capaz de promover um aumento na captação de glicose, e talvez isso ocorra por mecanismos independentes da via da insulina, porém em nosso estudo não investigamos tais possibilidades e por isso não faremos maiores considerações. Por fim, nosso estudo mostra que numa única sessão de exercício a intensidade não influenciou significativamente os parâmetros avaliados em camundongos obesos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos em nosso estudo notamos que a obesidade induzida por dieta rica em gordura prejudica a captação de glicose, interferindo na via de sinalização da insulina. Como observado em nosso estudo animais obesos sedentários apresentaram redução significativa na fosforilação da Akt, proteína chave para ocorrer a translocação do GLUT-4. Por outro lado, os animais exercitados agudamente por 1 hora sem ou com sobrecarga adicional tiveram um aumento significativo na fosforilação desta proteína, confirmando o efeito positivo do exercício físico na condição de resistência à insulina. Tal resultado, mostra que pelo menos quando se trata de uma única sessão a intensidade não tem implicações relevantes.

No entanto, mais estudos devem ser realizados para analisar o efeito do exercício físico em diferentes intensidades em animais resistentes à insulina. Além disso, devem ser realizados estudos com treinamento físico para ver se de fato a intensidade não tem repercussões significativas na via molecular de sinalização da insulina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, H.; IHLEMANN, J.; HELLSTEN, Y., et al. Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contractionstimulated glucose transport in rat muscle. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabology**, v.282, n.6, p.E1291-1300, 2002.
- ALMÉRAS, N.; LEMIEUX, S.; BOUCHARD, C., et al. Fat gain in female Swimmers. **Physiological Behavior**, v.61, p.811-917, 1997.
- APPLEGATE, E.A.; STERN J.S. Exercise termination effects on food intake, plasma insulin, and adipose tissue lipoprotein lipase activity in the Osborne-Mendel rat. **Metabolism**, v.36, p.709-714, 1987.

- ARCIERO, P.J.; SMITH, D.L.; CALLES-ESCADON, J. Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. **Journal of Applied Physiology**, v.84, p.1365-1373, 1998.
- BACKER, J.M.; MYERS, M.G.JR.; SHOELSON, S.E., et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The Embo Journal**, v.11, n.9, p.3469-3479, 1992.
- BASSUK, S.S.; MANSON, J.E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Journal of Applied Physiology**, v.99, n.3, p.1193-1204, 2005.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72: 248–254, 1976.
- BURN, J.H.; DALE, H.H. On the location of action of insulin. **Journal of Physiology**, v. 59, n.6, p.164-192, 1924.
- DANDONA, P.; ALJADA A.; BANDYOPADHYAY A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends immunology** 25: 4-7, 2004.
- DELA, F.; MIKINES, K.J.; LARSEN, J.J., et al. Glucose clearance in aged trained skeletal muscle during maximal insulin with superimposed exercise. **J App Phys**, 87(6):2059-67, 1999.
- ECKEL, R.H.; YOST, T.J. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. **Journal of Clinical Investigation**, v.80, p. 992-997, 1987.
- ERIKSSON, J.; TUOMINEN, J.; VALLE, T., et al. Aerobic endurance exercise or circuit-type resistance training for individuals with impaired glucose tolerance? **Hormone and Metabolic Research**, v.30, n.1, p.37-41, 1998.

- FISCHER, C.P.; BERNTSEN, A.; PERSTRUP, L.B., et al. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. **Scand J Med Sci Sports**. 5: 580-587, 2007.
- FUJII, N.; HAYASHI, T.; HIRSHMAN, M. F., et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, v.273, n.3, p.1150-1155, 2000.
- GOODYEAR, L.J.; KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.235-261, 1998.
- GUMBINER, B. The treatment of obesity in type 2 diabetes mellitus. **Primary Care**, 26(4):869-83, 1999.
- HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. The role of exercise and PGC1 in inflammation and chronic disease. **Nature** 454, 463-469, 2008.
- HARDIE, D.G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? **European Journal of Biochemistry**, v.246, n.2, p.259-273, 1997.
- HARDMAN, A.E. Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review. **Journal of Sports Sciences**, v.14, n.3, p.201-218, 1996.
- HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J.F.; GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.273, n.6 Pt 1, p.E1039-1051, 1997.
- HENRIKSEN, E.J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. **Journal Applied of Physiology**, v.93, n.2, p.788-796, 2002.

- HICKNER, A.C.; RACETTE, S.B.; BINDER, E.F. Suppression of whole body and regional lipolysis by insulin: effects of obesity and exercise. **J Clin Endocrinol Metabolism**, 84(11):217-27, 1999.
- HOLLOSZY, J.O., Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. **Journal Appl Physiol**, , v. 99, julho 2005.
- HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the development world: a growing challenge. **N Engl J Med**, 356: 213-215, 2007.
- HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int J Obes Relat Metab Disord** 27: S53-55, 2003.
- HOUWARD, J.A.; SHINEBARGER, M.H.; DOLAN, P.L., et al. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, v.264, p.896-901, 1993.
- HOWLETT, K.F.; SAKAMOTO, K.; HIRSHMAN, M.F., et al. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, v.51, n.2, p.479-483, 2002.
- KENNEDY, J.W.; HIRSHMAN, M.F.; GERVINO, E.V., et al. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.5, p.1192-1197, 1999.
- KERN, P.A. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal Clinical Investigation**, v.95, p.2111-2119, 1995.
- LEONG, K.S., WILDING, J.P. Obesity and diabetes. **Baillière's Clin Endocrinol Metabolism**,13(2):221-37, 1999.

- LUCIANO, E.; BESSA, LIMA, F. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Rev Cienc Biomed**;18:47-60, 1997.
- LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R., et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, n.1, p.149-157, 2002.
- MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69yr. **Diabetes Care** 15:1509-12,1992.
- MERCURI, N.; ARRECHEA, V. Atualização: Atividade Física e Diabetes Mellitus. **Diabetes Clínica**, n.5, p.347-49, 2001.
- MONDON, C.E.; DOLKAS, C.B.; REAVEN, G.M. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. **Am J Physiol**, 239(3):E169-77, 1980.
- PAULI, J.R. ; ROPELLE, E.R. ; CINTRA, D.E., et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt in dietary induce obese Wistar rats. **Journal of Physiology**, 586(2): 659-71, 2008.
- PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** 98: 1154-62, 2005.
- PRATLEY, R.E.; HAGBERG, J.M.; DENGEL, D.R., et al. Aerobic exercise training induced reductions in abdominal fat and glucose stimulated insulin responses in mild-aged and older men. **J Am Ger Soc**, 48(9):2022-33, 2000.

- ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; PRARA, P.O., et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise: the role of PTP-1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of Physiology**, v.12, p.1-11, 2006.
- SILVA, C.A.; LIMA, W.C. Efeito Benéfico do Exercício Físico no Controle Metabólico do Diabetes Mellitus Tipo 2 à Curto Prazo. **Rev. Bras Endocrinol Metabolism**, vol 46 nº 5, Outubro 2002.
- SHOELSON, S.E.; LEE J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **J Clin Invest** 106: 171-176, 2003.
- SRIWIJITKAMOL, A.; COLETTA, D.K.; WAJCBERG, E., et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**. 3: 836-848, 2007.
- TAGUCHI, T.; KISHIKAWA, H.; MOTOSHIMA, H., et al. Involvement of bradykinin in acute exercise-induced increase of glucose uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: studies in normal and diabetic humans and rats. **Metabolism**. V.49, n.7, p.920-30, 2000.
- TERAN-GARCIA, M.; RANKINEN, T.; KOZA, R.A., et al. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.288, n.6, p.E1168-78, 2005.
- TSUKUMO, D.M.; CARVALHO-FILHO, M.A. Carvalheira JB, et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced and insulin resistance. **Diabetes** 56: 1986-1998.

- WOJTASZEWSKI, J.F.; HIGAKI, Y.; HIRSHMAN, M.F., et al. Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, n.9, p.1257-1264, 1999.
- WAKI, H.; TONTONOZ P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2: 31-56, 2007.
- WALBERG, J.L.; GREENWOOD, M.R.C.; STERN, J.S. Lipoprotein lipase activity and lipolysis after swim training in obese Zucker rats. **American Journal Physiology Regulatory Comparative Physiology**, v.245, p.R706-R712, 1983.
- ZINKER, B.A. Nutrition and exercise in individuals with diabetes. **Clin Sports Medicine**, 10(3):585-606, 1999.