JOSÉ RODRIGO PAULI

## EFEITOS DO DESTREINAMENTO E DA DIETA HIPERLIPÍDICA NOS MECANISMOS MOLECULARES DE INDUÇÃO DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

**CAMPINAS** 

2007

i

JOSÉ RODRIGO PAULI

## EFEITOS DO DESTREINAMENTO E DA DIETA HIPERLIPÍDICA NOS MECANISMOS MOLECULARES DE INDUÇÃO DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

**CAMPINAS** 

2007

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

٦

P283e	<ul> <li>Pauli, José Rodrigo</li> <li>Efeitos do destreinamento e da dieta hiperlipídica nos mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulina / José</li> <li>Rodrigo Pauli. Campinas, SP : [s.n.], 2007.</li> </ul>
	Orientador : Mário Jose Abdalla Saad Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	<ol> <li>Destreinamento físico.</li> <li>Obesidade.</li> <li>Resistência à insulina.</li> <li>Inflamação. I. Saad, Mário José Abdalla.</li> <li>II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</li> <li>III. Título.</li> </ol>

# Título em inglês : Effects of detraining and high-fat diet on molecular mechanisms of obesity and insulin resistance

Keywords: • Detraining

Г

- Obesity
- Insulin resistance
- Inflammation

Titulação: Doutorado em Clínica Médica Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Mário José Abdalla Saad Profa. Dra. Eliete Luciano Prof Dr Cláudio Teodoro de Souza Prof Dr Marcos Antonio Tambascia Prof Dr Wilson Nadruz Junior

Data da defesa: 12-04-2007

### Banca examinadora da tese de Doutorado

### Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad

### **Membros:**

1.	Prof(a). Dr(a). Eliete Luciano
2.	Prof(a). Dr(a). Cláudio Teodoro de Souza
3.	Prof(a). Dr(a). Marcos Antonio Tambascia
4.	Prof(a). Dr(a). Wilson Nadruz Junior Clin holy
5.	Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Šaad

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/04/2007

200755348

UNICAMP Biblioteca Central César Lattes Desenvolvimento de Coleção

### DEDICATÓRIA

Para meus pais, José Pauli e Miriam Tonini Pauli. Com o exemplo deles, aprendi o que pode ser conseguido com força de vontade e pensamento positivo, também o significado de devoção e coragem, e sobretudo da importância da dignidade e do caráter. Quero iniciar meus agradecimentos a minha família. A meus pais, pelo incentivo e perseverança em todos esses anos. Com vocês aprendi a viver, a entender que temos muito que fazer, e que apenas começamos. A minhas irmãs pelo exemplo de honestidade e carinho

A Luciana, pela paciência, carinho e aconchego nos períodos conturbados do doutorado. Nosso dia iria chegar, teríamos nossa vez e isso não é pedir demais, pois não acontece nada sem lutar, é preciso acreditar e por isso agora somos um só.

Ao professor Mário Saad, que sempre diz: que não acontece nada se não muito tentar. Quanto mais vezes girar a centrifuga maior a chance do seu trabalho se concretizar. Sua sapiência e humanidade o tornam discretamente educador. Assim o faz, grande cientista e amigo. Aquele com quem podemos conversar não apenas do mundo acadêmico, mas de política, cultura, futebol, conversas de botequim e é nesses momentos que entendemos que inteligência é saber conviver com diferentes personalidades.

Ao professor José Barreto, que me mostrou o quanto criativo em ciência é preciso ser. Inovação e olhos atentos para as lacunas cientifícas são ensinamentos importantes que aprendi com você.

Ao professor Lício Velloso, com quem aprendi que organização e seriedade são fundamentos importantes na pesquisa.

Ao professor Aníbal e a Luciane (aluna de pós-doutorado), que abriram as portas de seu laboratório para realização de experimentos.

Ao Dennys, com quem aprendi muito nesses anos. Pela colaboração fiel na realização dos experimentos. Além disso, foi meu grande professor, com quem pude aprender um pouco mais a arte de lecionar e de preparar aulas. Que bom, que nessa vida podemos encontrar boas pessoas, com quem podemos rir e chorar e aprontar algumas travessuras no laboratório.

Ao Eduardo, pela convivência e discussões sobre temas inerentes a área de Educação Física. Os trabalhos feitos em conjunto trouxeram descobertas importantes ao mundo científico, e a área de Educação Física e isso foi fundamental para que nós tivéssemos o desejo de trabalhar assiduamente durante esses anos.

A Juliana, pelo jeito extrovertido e divertido de ser. Foram muitas as risadas e momentos de descontração dentro do laboratório. Além disso, sua contribuição tem sido importante na realização dos trabalhos acadêmicos.

Ao Cláudio (Cafu), pelo jeito simples de ser. Pelas discussões científicas, filosóficas, políticas, sobrenaturais, e conversas aleatórias, que tornaram o dia-dia mais alegre no ambiente de trabalho. Afinal de contas, "deixa o homem trabalhar".

Aos colegas pós-graduandos do laboratório que foram sempre importantes nas discussões científicas, nas realizações dos trabalhos e aprendizado técnico.

No cotidiano contei com o inestimável auxílio do Sr. Luiz Janeri, que com apoio incansável torna possível o trabalho no laboratório. Ao seu Jósimo Pinheiro, por suportar nossa bagunça. Aos funcionários do Biotério Central e do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, que me proporcionaram a realização dos experimentos com animais. Em especial, ao Márcio, pela amizade e dedicação.

Por fim, nessa versão final da tese, agradeço de modo especial, aos professores membro da banca, Profa. Dr. Eliete Luciano e Prof. Dr. Cláudio T. de Souza (Unesp-Rio Claro e Unicsul-SP) respectivamente, e aos Profs. Drs. Wilson Nadruz Júnior e Marcos Antonio Tambascia (Unicamp-SP), pela colaboração e empenho em ler o trabalho, contribuindo assim na produção final de um texto de conteúdo mais elaborado e de melhor qualidade.

Por fim, para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa, foi fundamental o apoio financeiro da CAPES.

### PÁG.

RESUMO		
ABSTRACT	xxvii	
1- INTRODUÇÃO	31	
1.1- Destreinamento físico, obesidade e resistência à insulina	36	
1.2- Mecanismos moleculares de ação da insulina	40	
1.3- Resistência à insulina e diabetes do tipo 2		
1.4- Mecanismos moleculares de resistência à insulina	43	
1.5- Obesidade, inflamação e resistência à insulina	44	
1.6- Obesidade, Diabetes e disfunção mitocondrial	49	
1.6.1- Proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs)	50	
1.6.2- Identificação e localização das UCPs	50	
1.6.3- UCP-3 e sua relação com obesidade	52	
1.6.4- Papel da UCP-3 no músculo esquelético	52	
1.6.5- UCP-3 e o exercício físico (agudo e crônico)	55	
1.6.6- UCP-3 e metabolismo de ácidos graxos	58	
1.6.7- Triglicerídeos intramuscular e diabetes do tipo 2	60	
2- OBJETIVOS	63	
3- MATERIAIS E MÉTODOS	67	
3.1- Animais experimentais e protocolos de pesquisa	69	
3.2- Programa de exercício físico		
3.3- Determinação da massa corporal	72	

3.4- Determinação da ingestão alimentar	
3.5- Determinação do peso e de gordura epididimal e perirenal	
3.6- Determinação da glicose plasmática	
3.7- Determinação da insulina	
3.8- Teste de Tolerância Intraperitoneal à Glicose	
3.9- Teste de Tolerância Intraperitoneal à Insulina	
3.10- Determinação do índice Homa	
3.11- Sacrifício dos animais e extração dos tecidos	
3.12- Imunoprecipitação	
3.13- Imunoblot	
3.14- Reagentes químicos, tampões e anticorpos	
3.15- Isolação das mitocôndrias do músculo esquelético	
3.16- Procedimentos de Incubação Padrão	
3.17- Medida do potencial elétrico transmembrana mitocondrial	
3.18- Determinação do conteúdo de triglicerídeos intramuscular	
3.19- Análise Estatística	
4- RESULTADOS	
4.1- Parâmetros fisiológicos e metabólicos	81
4.2- Características gerais dos animais	
4.3- Dados fisiológicos e moleculares da ação da insulina (15 dias)	
4.4- TGIM, expressão de UCP-3 e atividades das UCPs (15 dias).	87
4.5- Sinalização da insulina no fígado	
4.6- Sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio	

4.7- Sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal	94
4.8- Sinalização da via CAP/Cbl no tecido adiposo epididimal	96
4.9- Fosforilação do IRS-1 (Ser 307) nos tecidos	98
4.10- Ativação da JNK nos tecidos	98
4.11- Fosforilação e Degradação do IkBα nos tecidos	99
5- DISCUSSÃO	101
6- CONCLUSÃO	117
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8- ANEXOS	143

AGL	Ácidos graxos livres.
Akt (Protein Kinase B/Akt)	Proteína quinase B.
Camundongo <i>ob/ob</i>	Camundongo obeso que apresenta mutação do gene que codifica a leptina.
Cbl	produto do proto oncogene Cbl.
CAP (Cbl-associated protein)	Proteína adaptadora de Cbl.
САТ	carboxiatractilozídeo (CAT) (inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina (trocador ATP/ADP).
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2.
GLUT4	Transportador de glicose 4.
IR (Insulin Receptor)	Receptor de insulina.
IRS (Insulin Receptor Substrate)	Substrato do receptor de insulina.
IKK (IkappaB kinase)	complexo enzimático com atividade serina- quinase.
IL-1β	Interleucina 1β.
IL-6	Interleucina 6.
iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase)	Óxido Nítrico Sintase Induzível.
JNK	c-jun N –terminal quinase 1.
NFkB (Nuclear Factor Kappa B)	Fator de transcrição kappa B.
mTOR (mammalian Target of Rapamicyn)	Proteína alvo da Rapamicina.
PDK (Phosphoinositide-dependent Kinase)	Quinase ativada por fosfoinositídeos.

PI 3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase.
PTP-1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B)	Proteína Tirosina Fosfatase 1B.
РКС	Proteína Kinase C.
SH2 (Src Homology 2)	Domínios protéicos com homologia ao proto oncogene Src2.
TAB	Tecido adiposo Branco.
TGIM	Triglicerídeos Intramuscular.
TNFα (Tumor Necrosis Factor alfa)	Fator de necrose tumoral $\alpha$ .
UCPs (Unconpling Protein)	Proteínas desacopladoras mitocôndriais.
$\Delta \mu \mathrm{H}^+$	potencial eletroquímico de próton (H <sup>+</sup> ).

### RESUMO

A cessação do treinamento físico (destreinamento) resulta em rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos quanto em animais. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos. Diferentes proteínas intracelulares podem estar envolvidas no processo de aquisição de ganho de peso e diminuição na ação da insulina nesse modelo animal. Este estudo teve como objetivos investigar as vias PI 3-quinase/Akt e CAP/Cbl, ambas importantes na captação ou utilização de glicose estimulada por insulina nos tecidos muscular, hepático e adiposo branco. Além disso, nós investigamos a relação entre o progresso do ganho de peso com o processo inflamatório subclínico. Diversas serinas quinases como a JNK e IKKß emergem como reguladores metabólicos centrais no desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade e em virtude disso foram investigas em nosso modelo experimental. Por fim, tem sido estabelecido que a disfunção mitocondrial e o acúmulo de triglicerídeos intramuscular ou de seus metabólitos devido ao aumento da distribuição ou menor oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, podem contribuir com o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Nesse contexto, a UCP-3 tem papel primordial na regulação do dispêndio energético e acúmulo de metabólitos no músculo e por isso a expressão e atividade da UCP-3 foi alvo de investigação em nosso modelo experimental. Utilizou-se, ratos Wistar que foram submetidos a um protocolo de exercício de natação por 8 semanas. Posteriormente os animais foram destreinados e nesse mesmo período de cessamento do programa de exercício foi oferecida aos ratos uma dieta rica em lipídes. Para análise das proteínas de interesse, foi realizado o método de "immunoblotting e immunoprecipitation". Verifica-se, através dos resultados obtidos, que animais destreinados tem um ganho de peso e de gordura epididimal mais acentuado comparado a animais sedentários. Tal resultado deve-se no mínimo em parte a via CAP/Cbl que se encontra mais responsiva à insulina no tecido adiposo de animais destreinados em relação aos outros grupos experimentais. Além disso, encontramos aumento na expressão da JNK, da degradação do IkB e da fosforiilação em serina do IRS-1 no músculo dos animais destreinados e isso contribuiu com a insulinoresistência encontrada nesses animais durante o teste de tolerância à insulina. Por fim, o aumento do conteúdo de triglicérides intramuscular e a menor expressão de UCP-3 no músculo dos animais destreinados que receberam a dieta hiperlipídica interfere na sinalização da insulina e no ganho de peso. Conclui-se, que o destreinamento é caracterizado por uma série de alterações moleculares que favorecem ao ganho de peso, de gordura corporal e com a resistência à insulina quando associado com uma ingestão de dieta rica em lipídes.

### ABSTRACT

The cessation of physical training (detraining) results in rapid fat mass accretion, gain weight and insulin resistance in both humans and animals. However, little is know about the cellular basis for the effect. The aim of this study was to investigate the PI3-kinase/Akt and CAP/Cbl signaling pathways both involved with insulin-stimulated glucose uptake in peripherals tissues (muscle, adipose and liver) in detrained and sedentary animals submitted a high-fat diet. Moreover, we investigated the potential role of the inflammatory pathway in high fat diet-induced insulin resistant in rats detrained. Many mechanisms may contribute to the dysregulation of the insulin-signaling pathway. Several serine/threonine kinases are activated by inflammatory or stressful stimuli and contribute to inhibition of insulin signaling, including JNK, inhibitor of NF-kB kinase (IKK) and others. For these reason, we decided investigate the role of inflammatory process in obesity detraining-induced in development of the insulin-resistance in our experimental model. Finally, is possible that accumulation of intracellular fatty acyl-CoA or other fatty acid metabolites in muscle, either through increased delivery (due to increased caloric intake or alterations in adipocytes fatty acid metabolism) and/or decreased mitochondrial fatty acid oxidation, might be expected to induce insulin resistance in muscle. The UCP-3, present in skeletal muscles, may play a central role in the control of basal metabolic rate and body weight gain. However, there is no data about the effect of detraining on mitochondrial uncoupling in skeletal muscle tissue. We hypothesized that all of these possibilities could to occur under cessation physical exercise (detraining). So, Wistar rats were submitted to swimming training during 8 weeks. Next this period the animals stop the training and received a richfat diet. The proteins from the insulin signaling and inflammatory pathway were analyzed by immunoprecipitation and immunoblotting. The results demonstrated that detraining result in an increased body mass and rapid body fat accretion. This fact was associated with increases insulin responsiveness through CAP/Cbl pathway in adipose tissue in the detrained animals feeding with a rich-fat diet (HFD) than sedentary rats feeding with HFD. Moreover, in this study, we observed that high-fat diet lead an increased JNK activity, disappearance of IkB and IRS-1 phosphorylation at serine in muscle tissue of the detrained rats when compared to sedentary animals. These results indicate that this serine kinases is one of the causes of insulin resistance to found in the insulin tolerance test. Finally, the increased intramyocellular lipid content and a lesser UCP-3 expression in muscle of detrained rats that receive a high-fat diet interfere with insulin signaling and with body weight gain. In conclusion, the detraining is characterized to several molecular alterations that contribute to more body weight gain, fat accretion and insulin resistance when associated with a fed rich-fat diet.

# 1- INTRODUÇÃO

O exercício físico tem sido considerado uma das pedras angulares tanto da prevenção quanto do tratamento do Diabetes do tipo 2. Desde o primeiro indício, de que a contração muscular favorece a entrada de glicose para dentro da célula, quando Chauveau e Kaufman reportaram redução na concentração de glicose proveniente da musculatura de masseter de cavalos enquanto eles mastigavam, uma série de investigações buscaram elucidar a possível interação entre insulina e exercício físico na regulação da captação de glicose (Chauveau & Kaufaman, 1887).

Hoje, sabe-se que a atividade física aumenta a sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal, e o principal efeito do exercício parece ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética (Luciano *et al.*, 2002; O'Donovan *et al.*, 2005; Teran-Garcia *et al.*, 2005). Além da melhora da sensibilidade à insulina no músculo, há evidências de que a resistência à insulina no fígado também pode ser reduzida (caracterizada pela redução da produção hepática de glicose), bem como pode ocorrer aumento da captação de glicose pelos adipócitos após o exercício físico (Rodnick *et al.*, 1987; Peres *et al.*, 2005). Portanto, se aceita que a atividade física pode melhorar a sensibilidade à insulina por meio de efeitos no músculo, no fígado e no tecido adiposo (Rodnick *et al.*, 1987; Goodyear & Kahn, 1998).

Por outro lado, a cessação do treinamento físico (destreinamento) resulta em rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos (Marti & Howald, 1990; Kujala *et al.*, 1994), quanto em animais (Craig *et al.*, 1983; Applegate & Stern, 1987; Lambert *et al.*, 1994). Tal consideração pode ser reforçada por outros estudos que demonstraram que a sensibilidade à insulina decresce em alguns dias quando indivíduos fisicamente ativos se tornam sedentários (Houmard *et al.*, 1996; Arciero *et al.*, 1998). Considerando as evidências descritas acima, pode-se dizer que o músculo esquelético tem papel primordial sobre a redução da utilização de glicose estimulada por insulina na situação de inatividade física.

Além disso, o tecido adiposo branco (TAB) é considerado um importante local de entrada de glicose, que pode ser convertida e armazenada como triacilgliceróis. Este depósito de energia é extremamente importante para o organismo principalmente em situações de privação alimentar. Tem sido demonstrado que o exercício físico regular promove uma diminuição no tamanho dos adipócitos, que se tornam mais responsivos à insulina. Associado a esta maior eficiência da ação da insulina ocorre também aumento na atividade de enzimas lipogênicas como, por exemplo, da lipoproteína lípase após o esforço físico (Lambert *et al.*, 1994; Peres *et al.*, 2005). Tais adaptações metabólicas são fundamentais aos indivíduos fisicamente ativos, pois é através delas que o organismo se abastece e se protege contra um eventual dispêndio excessivo de energia, que pode vir a ocorrer em sessões subseqüentes da rotina de treinamentos. Por outro lado, as mesmas adaptações parecem ser desfavoráveis quando pessoas físicamente ativas se tornam sedentárias, uma vez que o dispêndio energético não acontecendo favorece a aquisição de maior peso corporal. Fato interessante, é que a diminuição do dispêndio energético com a interrupção dos exercícios habituais não é acompanhada por uma correspondente diminuição na ingestão alimentar. Assim, pode-se sugerir que o destreinamento desempenha papel importante no desenvolvimento da obesidade.

A influência do destreinamento no balanço energético foi investigada por alguns pesquisadores, que notaram que a redução na atividade física não induz uma redução na ingestão calórica e resulta, portanto num balanço energético positivo e desse modo favorece ao acréscimo do peso corporal (Mayer, 1953; Schulz & Schoeller, 1994; Murgatroyd *et al.*, 1999).

Em acordo com essa idéia, é de se suspeitar, que tais adaptações possam ser ainda mais problemáticas se em conjunto com o destreinamento houver uma maior ingestão de calorias advindas da dieta (ex. dieta hiperlipídica). Pode-se sugerir que a disponibilidade do tecido adiposo em armazenar energia frente à abundância de alimento pode acarretar no desenvolvimento da obesidade e consequentemente das anormalidades metabólicas associadas a esta doença como: resistência à insulina, hipertensão, dislipidemias, entre outras, de uma maneira mais acentuada e rápida em indivíduos destreinados do que em indivíduos não praticantes de atividade física (sedentários). No entanto, tais considerações feitas acima são apenas hipóteses baseadas em dados da literatura, mas que ainda não foram minuciosamente investigadas, e como parecem bastante pertinentes e passíveis de acontecer com indivíduos fisicamente ativos que se tornam sedentários, entender melhor os mecanismos moleculares que levam ao ganho de peso e a diminuição na captação de glicose poderá auxiliar na tomada de medidas preventivas que poderão diminuir as chances de indivíduos virem a desenvolver obesidade e diabetes mellitus com a inatividade física.

Em decorrência de estudos recentes (últimos 15 anos), e com a descoberta da propriedade do TAB de secretar substancias com importantes efeitos biológicos, grande importância foi atribuída ao seu papel endócrino (Ahima & Flier, 2000; Fruhbeck et al., 2001). Com a descoberta de uma ampla gama de proteínas secretadas pelo TAB, denominadas adipocinas um novo conceito de função biológica deste tecido vem surgindo, consolidando a idéia de o tecido adiposo ser não apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas sim, um órgão dinâmico envolvido em uma variedade de processos metabólicos e fisiológicos (Kershaw & Flier, 2004; Tilg & Moschen, 2006). O seu envolvimento em processos como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, aterosclerose, dislipidemias, processos inflamatórios agudos e crônicos, entre outros, indicam que este tecido tem participação importante na regulação do metabolismo e por isso pode estar envolvido nas alterações endócrinas e metabólicas encontradas no destreinamento. Sabe-se, que as citocinas pró-inflamatórias produzidas e secretadas pelos adipócitos induzem resistência à insulina e alterações na secreção deste hormônio. Dentre as citocinas secretadas pelos adipócitos o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) correlaciona negativamente com o metabolismo da glicose (Hotamisligil et al., 1993; Warne, 2003). Além disso, o TNF-a está envolvido na ativação de proteínas de via inflamatórias, como a ativação da JNK (c-jun-N-terminal kinase) (Aguirre et al., 2000; Hirosumi et al., 2002). A JNK também diminui o sinal da insulina por mecanismos que interferem na fosforilação do receptor de insulina e dos seus substratos (IRS-1 e IRS-2), regulando negativamente a propagação do sinal intracelular desse hormônio (Hotamisligil et al., 1996; Hirosumi et al., 2002; Lee et al., 2003; Wellen & Hotamisligil, 2005). Além da JNK, uma outra via inflamatória ativada pelo TNF-α tem recebido muita atenção nos últimos anos devido ao seu potencial para estabelecer conexões entre resposta inflamatória e resistência à insulina: a via da IKK/IkB/NFkB (Gao et al., 2002; Dempsey et al., 2003a). Em animais obesos induzidos por dieta, o bloqueio da atividade da IKKβ com a administração de altas doses de salicilatos (AAS) resulta em melhora da sensibilidade à insulina (Yuan et al., 2001a). Assim, discutir com

maior detalhes a participação do sistema imunológico, parece bastante viável, já que a situação de destreinamento tem sido associada com o acúmulo rápido de massa adiposa.

Por fim, nos últimos anos inúmeras pesquisas buscaram investigar a participação de proteínas desacopladoras mitocôndriais (UCPs), principalmente as isoformas presentes na musculatura esquelética (UCP-2 e UCP-3), no desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina (Millet *et al.*, 1997; Samec *et al.*, 1999; Schrauwen *et al.*, 1999; Hesselink *et al.*, 2003). Observa-se, alteração na funcionalidade destas proteínas em mitocôndriais de animais obesos e diabéticos (Oberkofler *et al.*, 1998; Samec *et al.*, 1999). No entanto, pouco se sabe do comportamento delas com o destreinamento. Como as UCPs desempenham papel importante no controle do dispêndio energético e sobre o metabolismo de ácidos graxos, vamos discutir com maior detalhe o assunto quando abordarmos a participação destas proteínas em diferentes situações: exercício físico, dieta hiperlipídica, jejum, entre outras. É possível, que exista conexão entre UCPs e obesidade e resistência à insulina adquiridas com o destreinamento.

Portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com o ganho excessivo de peso, rápido acréscimo da massa adiposa e resistência à insulina com o destreinamento se tornam importantes, uma vez que o assunto tem sido pouco investigado, e novas descobertas poderão auxiliar na prevenção do desenvolvimento da obesidade e do diabetes do tipo 2. Para o melhor entendimento da relação destreinamento e acréscimo de tecido adiposo e resistência á insulina, faremos uma breve discussão do assunto levando em consideração a opinião científica sobre estes tópicos, que serão sumarizados a seguir nesta tese de doutorado

### 1.1- Destreinamento físico, obesidade e resistência à insulina

O diabetes do tipo 2 é uma doença que esta associada com uma série de alterações metabólicas caracterizada por hiperglicemia. A etiologia responsável em seu desenvolvimento não está completamente estabelecida. No entanto, sabe-se, que há um componente genético, ainda não definido, e a obesidade, o sedentarismo, o estresse, o

consumo de dietas hipercalóricas e o envelhecimento desencadeiam ou aceleram o aparecimento desta doença (Hamann, 2002). Nos últimos anos intensa investigação dos fatores envolvidos no desenvolvimento do diabetes, trouxe grande progresso na definição das características clínicas dos indivíduos que desenvolverão DM2, bem como em alterações moleculares envolvidas na patogênese dessa forma de diabetes (Shulman, 2004).

A compreensão minuciosa dos fatores que aceleram e resultam no DM2 tem facilitado à intervenção preventiva bem como o tratamento quando a doença está instalada. Estudos transversais em diferentes populações mostram que indivíduos com intolerância à glicose têm em geral sobrepeso ou são obesos, resistentes à insulina e também apresentam níveis insulinêmicos mais elevados. Assim, alterações na sensibilidade e na secreção de insulina são eventos metabólicos que podem ser identificados em indivíduos que desenvolverão diabetes, anos antes da doença se tornar evidente. Estas anormalidades se agravam na evolução de uma situação de tolerância a glicose normal para intolerância, e finalmente DM2 (Kahn, 2001a, b; Porte & Kahn, 2001; Zimmet et al., 2001; Lingohr et al., 2002). Como a obesidade constitui-se num fator com relação direta com resistência à insulina e com o desenvolvimento do DM2, inúmeras pesquisas vem sendo realizadas com a preocupação de entender os mais diversos fatores que contribuem com o ganho de peso e conseqüentemente levam a obesidade (Flier, 2004; Wellen & Hotamisligil, 2005; Herman & Kahn, 2006). Dentre os fatores envolvidos, o consumo de dietas hipercalóricas e o estilo de vida sedentário têm sido intensamente estudados e correlacionados com essa pandemia de obesidade (Booth et al., 2002; Hill et al., 2003; Xu et al., 2003; Kershaw & Flier, 2004; De Souza et al., 2005a; Kretschmer et al., 2005; Prada et al., 2005; Hill, 2006). No entanto, alguns pesquisadores têm se preocupado em investigar as adaptações que ocorrem no organismo numa situação de interrupção da prática regular de exercícios físicos (Lambert et al., 1994; Petibois et al., 2004; Kump & Booth, 2005). Um Curto período de destreinamento tem sido caracterizado pelo aumento na massa corporal, do conteúdo de gordura e tamanho dos adipócitos (Booth et al., 1974; Craig et al., 1983). Além disso, nesse período de inatividade física ocorre aumento da atividade de enzimas lipogênicas envolvidas na síntese de ácido graxo (Dohm et al., 1977; Sandretto & Tsai, 1988; Lambert et al., 1994) e lipogenesis do tecido adiposo (Applegate et al., 1984; Applegate & Stern, 1987; Simsolo et al., 1993). Em longo prazo,

estudos que procuraram acompanhar ex-atletas têm mostrado que estes adquirem aumento de peso e apresentam alterações na glicemia de jejum com a redução ou cessamento do treinamento físico (King *et al.*, 1988; Almeras *et al.*, 1997; Arciero *et al.*, 1998).

Entretanto, o destreinamento tem sido associado com aumento na ingestão alimentar, especialmente em ratos geneticamente predispostos a obesidade e que adquirem rápidos aumentos de peso em resposta a uma dieta palatável (hipercalóricas e/ou hiperlipídicas) (Schemmel *et al.*, 1970; Applegate *et al.*, 1984; Applegate & Stern, 1987). Em humanos, as pesquisas feitas não conseguem identificar com absoluta certeza se as mudanças encontradas no período de destreinamento são em resposta a alterações na alimentação, pois não são realizadas com a submissão do inquérito alimentar (recordatário da ingestão de alimentos diários) ou pelo cessamento do exercício físico por si (Melzer *et al.*, 2005).

Evidências científicas sugerem que após situações de privação alimentar ou após uma sessão de exercício agudo, a atividade da enzima lipoproteína lípase é aumentada e isso favorece a hidrolise extracelular dos triglicerídeos para então posterior captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo (Boyle *et al.*, 1981; Fried *et al.*, 1983; Eckel & Yost, 1987; Walberg et al., 1983). Em estudo recente, Peres e colaboradores observaram que ocorre uma melhor resposta a insulina em adipócitos de animais exercitados quando comparados aos controles (Peres *et al.*, 2005). Este aumento na responsividade a insulina no tecido adiposo deveu-se a uma melhora da via PI 3-quinase/Akt estimulada por insulina, quando avaliada após 24 horas da última sessão de exercício físico dos animais. A PI 3-quinase é uma enzima considerada chave na captação de glicose estimulada por insulina. Portanto, sugere-se que a permanência de maior atividade desta via no destreinamento favoreça o acréscimo de peso e de gordura corporal, pois a glicose ao ser convertida pode ser armazenada na forma de triacilgliceróis no tecido adiposo.

Existe também forte relação entre inatividade física e resistência à insulina (Kriska *et al.*, 1993; Mayer-Davis *et al.*, 1998). Tal evidência é suportada por pesquisadores que verificaram uma diminuição na sensibilidade à insulina em poucos dias quando humanos físicamente ativos tornaram-se sedentários, havendo uma queda na captação de glicose estimulada por insulina. Por exemplo, a área sob a curva de insulina durante o teste

de tolerância à glicose oral aumentou 73, 30, ou 93% quando indivíduos treinados deixaram de se exercitar por 7-10, 14, ou 10 dias, respectivamente (Heath *et al.*, 1983; Houmard *et al.*, 1993; Houmard *et al.*, 1996; Arciero *et al.*, 1998). Parece então, que a sensibilidade à insulina declina dentro de poucos dias de inatividade física. No entanto, os motivos que levam a essa queda na sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis após poucos dias de destreinamento ainda não foi elucidado. Estudo recente, mostrou que esta diminuição na captação de glicose é acompanhada por concomitante diminuição de proteínas da cascata de sinalização da insulina (Kump & Booth, 2005). Os pesquisadores verificaram que a interrupção do treinamento é acompanhada por uma diminuição na expressão do receptor de insulina (IR), da fosforilação em tirosina do IR, fosforilação da Akt, e concentração de GLUT-4 após estímulo com insulina em músculo esquelético. Tais alterações aconteceram 29 e 53 horas após a última sessão de exercício físico. Isto demonstra que alterações intracelulares estão associadas com a queda na sensibilidade à insulina com a interrupção do treinamento.

No entanto, apesar do interesse de alguns pesquisadores por estudos relacionando destreinamento físico, obesidade e resistência à insulina, ainda há muito que ser pesquisado, principalmente quando se trata de estudos com períodos maiores de tempo, haja vista que os estudos são realizados entre 24 horas e duas semanas após a última sessão de exercício (Lambert *et al.*, 1994; Kump & Booth, 2005; Peres *et al.*, 2005) e, é possível que alterações importantes aconteçam mais tardiamente.

A partir destes achados científicos, sugere-se que a insulina, sendo primordial tanto no controle lipôgenico como também no metabolismo da glicose, tenha participação nas mudanças encontradas no peso corporal, deposição de gordura e na captação de glicose em modelos experimentais de destreinamento. Assim, é importante investigar a via de sinalização desse hormônio nos diferentes tecidos periféricos (músculo, fígado e adiposo) após o cessamento do exercício físico. Para que sejam compreendidos os mecanismos moleculares de ação da insulina e como as alterações que acontecem na cascata de sinalização deste hormônio contribuem para a patogênese do DM2 é necessário inicialmente descrever como a insulina transmite seu sinal desde seu receptor até os efetores finais.

#### 1.2- Mecanismos moleculares de ação da insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Sua ação acontece em vários tecidos periféricos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise, entre outros (Saltiel & Kahn, 2001).

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta denominado receptor de insulina (IR) (Saltiel & Kahn, 2001). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e (IRS-2) (White, 1998).

A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para uma outra proteína citosólica denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-q), promovendo sua ativação. A PI 3-q é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular, e transporte de glicose estimulada pela insulina (Saad *et al.*, 1992; Shepherd *et al.*, 1995). A PI 3-q foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3-q ativa o sítio catalítico associado (Backer *et al.*, 1992; Cantley, 2002). A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinositídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3-4-difosfato e fosfatilinositol-3-4-5-trifosfato. Atualmente a PI 3-q é a única molécula intracelular essencial para o transporte de glicose (Saltiel & Kahn, 2001).

A ativação da PI 3-q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) (Saltiel & Kahn, 2001), que então estimula o transporte de glicose no músculo e tecido adiposo, estimula a síntese de glicogênio no fígado e músculo, e estimula a lipogênese no tecido adiposo. Portanto, a via PI 3-quinase/Akt tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina. Esquema resumido das etapas de sinalização da insulina encontra-se apresentado na figura 1.



Figura 1- Via de sinalização da insulina

Além da ativação da PI 3-quinase, outros sinais também podem ser necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose (Saltiel & Kahn, 2001). Essa segunda via envolve a fosforilação do protooncogenese c-Cbl e é aparentemente independente da ativação da PI 3-q (Ribon *et al.*, 1998). Na maioria dos tecidos sensíveis á insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP ("Cbl-associated protein") (Ribon et al., 1998). Após a fosforilação o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína adaptadora CrkII, que também está constitutivamente associada com a proteína C3G (Baumann *et al.*, 2000). A C3G é uma proteína trocadora de nucleotíeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, ativando-a. Uma vez ativada, a TC10 desencadeia um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT-4 para a membrana celular, em paralelo à ativação da via da PI 3-quinase (Chiang *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado que a insulina estimula agudamente a fosforilação em tirosina de Cbl e sua associação com a CAP no tecido adiposo de animais normais, e também que essa via pode participar do controle da adiposidade em modelos animais de resistência à insulina

(Prada *et al.*, 2005). Esquema resumido da via de sinalização da insulina (CAP/Cbl) encontra-se apresentado na figura 1.

Desde que as vias PI 3-q/Akt e CAP/Cbl desempenham papel importante na captação de glicose, sugere-se, que ambas possam determinar pelo menos em parte, a entrada de glicose no tecido adiposo e consequentemente contribuírem com o aumento da massa adiposa corporal. No entanto, qual seria o comportamento destas vias moleculares numa situação de destreinamento associado a uma sobrecarga energética, proporcionada por exemplo, pela ingestão de uma dieta hiperlipídica.

Estudo anterior em nosso laboratório mostrou através da análise da captação de glicose marcada, que a dieta rica em lipídes induz uma regulação tecido específica no transporte de glicose, com menor captação de glicose e sinalização insulínica no músculo esquelético, acompanhada por um aumento na captação desta hexose no tecido adiposo, sem alterar a sinalização da insulina neste tecido (Prada *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que o mecanismo molecular envolvido no aumento do transporte de glicose no tecido adiposo é independente da via PI 3-q/Akt. Entretanto, a expressão da CAP e Cbl, e também, a ativação desta via foi aumentada no tecido adiposo, mas não no músculo esquelético destes animais. Assim, parece que a via CAP/Cbl desempenha papel essencial no tecido adiposo, e não tem participação significativa no metabolismo de glicose do músculo esquelético. Diante desses resultados, a avaliação desta via molecular frente a uma situação de destreinamento é pertinente de investigação.

### 1.3- Resistência à insulina e diabetes do tipo 2

Entender o processo de desenvolvimento de resistência á insulina é crucial para compreender e ter ações preventivas contra o surgimento do diabetes do tipo 2. Hoje, entendemos que a resistência à insulina acontece em vários tecidos envolvidos com seus efeitos metabólicos. Em tecido muscular há uma menor captação de glicose induzida por insulina. No fígado, há maior produção de glicose e gliconeogênese. No tecido adiposo, a captação de glicose está diminuída, mas os efeitos de hipertrofia continuam contribuindo

para o desenvolvimento da obesidade (Kahn, 1994; Saltiel & Kahn, 2001). No entanto, o aparecimento clínico do diabetes está relacionado a um evento posterior ao surgimento da resistência à insulina, que é a falência secundária da célula β pancreática, que num determinado momento da evolução clínica do paciente perde a capacidade de compensar a resistência à insulina, com o aumento de sua secreção (Levy *et al.*, 1998). Vários estudos epidemiológicos, realizados em diferentes grupos populacionais, mostram que o diabetes tipo 2 se desenvolve inicialmente pelo aparecimento de resistência à insulina, que precede a hiperglicemia, que só ocorre após a perda da capacidade compensatória de secreção de insulina (DeFronzo, 1988). Tal ocorrência, ao que tudo indica depende de características genéticas individuais, já que pessoas obesas hiperinsulinêmicas podem não desenvolver diabetes do tipo 2 ao longo da vida.

Existem evidências científicas que demonstram que o destreinamento se caracteriza num fator importante relacionado ao ganho excessivo de peso e resistência à insulina (Lambert *et al.*, 1994; Houmard *et al.*, 1996). Apesar desta evidente relação, as bases moleculares envolvidas ainda permanecem desconhecidas. O entendimento dos mecanismos moleculares de resistência à insulina e obesidade envolvidas com o destreinamento físico é fundamental para a prevenção do diabetes do tipo 2 e para a busca de uma terapêutica eficaz.

Veremos a seguir, que inúmeros fatores podem regular negativamente a ação da insulina, agindo tanto no receptor de insulina quanto em moléculas pós-receptor. E mais, identifica-se que inúmeros fatores são produzidos pelos adipócitos e por isso existe uma forte associação entre obesidade e resistência á insulina.

#### 1.4- Mecanismos moleculares de resistência à insulina

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência à insulina periférica e até mesmo central (sistema nervoso) em indivíduos obesos, incluindo uma redução na expressão do IRS-1 e IRS-2 (induzidos por um aumento na degradação ou pela diminuição destas proteínas), fosforilação em serina do IR ou IRSs (induzido por serina quinases como mTOR, e as quinases de estresse como JNK e IKKβ), por um aumento na atividade ou na quantidade de enzimas que normalmente reverte a ação da insulina, as fosfatases intracelulares, como, por exemplo, a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) ou por um aumento na Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) (Hotamisligil *et al.*, 1996; Bedard *et al.*, 1997; Elchebly *et al.*, 1999; Perreault & Marette, 2001; Hirosumi *et al.*, 2002; Carvalho-Filho *et al.*, 2005; Ropelle *et al.*, 2006).

Dentre os mecanismos inibitórios da ação da insulina a fosforilação em serina do IR e dos IRSs tem sido amplamente investigados. Uma vez fosforilado em serina, o IRS-1 torna-se incapaz de ser fosforilado em tirosina, impedindo a ativação da PI 3-q, bloqueando a transmissão do sinal insulínico (Paz *et al.*, 1997; Aguirre *et al.*, 2002). Além disso, o IRS-1 fosforilado em serina pode inibir retrogradamente a ativação do IR, pois uma vez ligado ao receptor, inibe sua capacidade tirosina-quinase, impedindo a transmissão do sinal da insulina para outras moléculas de IRS-1, ou ainda para outros substratos deste receptor (Hotamisligil *et al.*, 1996). Diversas serinas quinases foram identificadas como capazes de fosforilar o IRS-1 em serina, como por exemplo, a c-jun N-terminal quinase 1 (JNK1) (Aguirre *et al.*, 2000) e o complexo do IKK (Gao *et al.*, 2002). A participação negativa dessas quinases na via de sinalização da insulina tem sido estudada em modelos experimentais de indução de obesidade por dieta hiperlipídica (Kim *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002). Vamos investigar com mais detalhes os mecanismos de indução de resistência á insulina através da ativação de vias de resposta inflamatórias a seguir, quando discutimos o elo molecular entre sistemas metabólicos e imunológicos.

#### 1.5- Obesidade, inflamação e resistência à insulina

Estudos anteriores sugerem que a existência de um "genótipo econômico" poderia contribuir para explicar o aumento marcante na incidência do Diabetes Mellitus tipo 2 e resistência à insulina na civilização ocidental nos últimos anos (Hirosumi *et al.*, 2002; Khovidhunkit *et al.*, 2004; Pickup, 2004; Wellen & Hotamisligil, 2005). Segundo essa hipótese, o ser humano provavelmente selecionou genes ao longo de sua evolução que poderiam favorecer o armazenamento de alimentos, o que

seria vantajoso na era pré-agricultura, onde a escassez de alimentos era proeminente. Entretanto, quando se expõe essas populações com genes econômicos à abundância alimentar, há maior armazenamento de energia no tecido adiposo, obesidade e possivelmente resistência à insulina (Peters *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2003). Seguindo essa idéia, é possível que animais treinados desenvolvam mecanismos eficientes de armazenamento de energia a fim de reservar substratos para as próximas sessões de treinamento. Assim, nossa hipótese é de que uma situação de destreinamento associado a uma oferta abundante de alimentos resulte num aumento expressivo de peso e de gordura corporal.

Além disso, demonstrou-se nos últimos anos que pacientes com resistência à insulina, obesidade e (ou) diabetes do tipo 2 apresentam um fenômeno inflamatório subclínico acompanhado por elevação dos níveis circulantes de interleucinas (IL-1β, IL-6, IL-8) e proteínas de fase aguda (Fasshauer & Paschke, 2003; Tuttle et al., 2004). Traçando um paralelo com o "genótipo econômico", pode ser levantada a hipótese de que a resistência à insulina e o diabetes tipo 2 podem ser conseqüências de "genótipos inflamatórios" (Rajala & Scherer, 2003; Wellen & Hotamisligil, 2005; Tilg & Moschen, 2006). Assim, supõe-se que ao longo da história da evolução, o ser humano selecionou também genes que poderiam induzir uma resposta imunológica mais eficaz. Tal adaptação foi essencial à sobrevivência do homem, pois não se tinham antibióticos e/ou vacinas naquela época. Nesse sentido, é possível que pessoas com melhor resposta imunológica, ao apresentarem obesidade, podem com mais facilidade desenvolver resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (Stein & Colditz, 2004). Nesse contexto, sabe-se, que o exercício físico aeróbio regular além de promover benefícios ao sistema cardiovascular, metabólico, também promove adaptações favoráveis ao sistema imunológico, o que torna os indivíduos mais resistentes a infecções (Nieman & Pedersen, 1999; Karacabey, 2005; Crepilho et al., 2006). Assim, sugerimos que a maior capacidade em armazenar energia em conjunto com a alta eficiência do sistema inume inato adquiridos com o treinamento pode conduzir a pessoa numa situação de destreinamento a um rápido ganho de peso e uma precoce e acentuada resistência à insulina se comparada a uma pessoa sedentária. Acreditamos que tal hipótese, possa ser agravada principalmente, se no período de destreinamento houver fartura de alimento hipercalóricos.

Portanto, segundo teorias evolutivas, a sobrevivência de organismos multicelulares depende da sua capacidade para combater infecções, reparar danos e de armazenar energia para os períodos de maior demanda energética (ex. esforço físico) ou privação de alimentos (Peters et al., 2002; Hill, 2006). Acredita-se, por isso, que durante a evolução as vias imunológicas e metabólicas tenham sido altamente conservadas e interdependentes. Muitos hormônios, citocinas, proteínas sinalizadoras e fatores de transcrição podem desempenhar tanto funções metabólicas quanto imunológicas. Além de usar as mesmas estruturas celulares, os sistemas metabólico e imunológico também se regulam um ao outro. Por exemplo, a resposta inflamatória favorece um estado catabólico e suprime as vias anabólicas, incluindo a altamente conservada via de sinalização intracelular da insulina (Wannamethee & Shaper, 1999; Tilg & Moschen, 2006). Tal adaptação é benéfica para a manutenção da homeostase em situações normais (defesa do organismo), mas pode tornar-se prejudicial em situações de desnutrição ou excesso de ingestão calórica (obesidade). A associação entre desnutrição e imunossupressão é bastante conhecida. Faz parte da resposta imunológica normal a mobilização de energia dos estoques para combater o agente agressor (Khovidhunkit *et al.*, 2004). E há muito tempo são conhecidos os efeitos da má-nutrição sobre o sistema imunológico, que causa importante, e clinicamente reconhecida, imunossupressão (Chandra, 1996; Blackburn, 2001). O elo que faltava desta interdependência começou a ser desvendado ao longo das últimas décadas, com o reconhecimento de que a obesidade, estado de fartura energética, está relacionada a um estado pró-inflamatório subclínico relacionado a doenças como: hipertensão, aterosclerose, diabetes do tipo 2, entre outras, que tem diminuído a qualidade e a expectativa de vida das pessoas (Wellen & Hotamisligil, 2005). A partir deste papel proeminente do tecido adiposo em participar do controle metabólico, é possível que a gordura adquirida com o destreinamento tenha papel fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina.

Durante os últimos anos, evidências experimentais e clínicas têm revelado que além de sua função primordial como órgão de estoque de energia, o tecido adiposo desempenha função endócrina e moduladora da resposta imune (Wannamethee & Shaper, 1999; Hotamisligil, 2000; Rajala & Scherer, 2003; Xu *et al.*, 2003; Wellen & Hotamisligil, 2005; Tilg & Moschen, 2006). O primeiro elo molecular entre inflamação e obesidade foi descoberto a pouco mais de uma década atrás, quando identificou-se que o fator de necrose

tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), uma citocina inflamatória tinha uma expressão elevada no tecido adiposo de modelos de animais de obesidade (Hotamisligil *et al.*, 1993). O TNF- $\alpha$  foi descrito inicialmente como o princípio ativo que conduzia a necrose tumoral em animais com infecção bacteriana (Gray *et al.*, 1984; Pennica *et al.*, 1984). Como todas as interleucinas, o TNF- $\alpha$  possui um grande número de ações fisiológicas, e desencadeia suas funções intra-celulares a partir da ligação com seu receptor de membrana (Heller & Kronke, 1994).

O TNF- $\alpha$  age através de dois receptores distintos denominados TNFR1 e TNFR2. Tais receptores apresentam algum grau de homologia na sua porção extracelular, sítio de ligação da citocina, porém na sua porção intracelular são completamente distintos, o que indica que cumprem funções particulares (MacEwan, 2002). Agindo através de TNFR1, TNF-α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de reposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular (Gupta, 2002; MacEwan, 2002). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF- $\alpha$  é a serina quinase JNK (Dempsey et al., 2003b). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (Dempsey et al., 2003b). Entretanto, a atividade serina quinase da JNK pode atuar sobre outros substratos, inclusive os substratos tradicionais do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 (Hotamisligil, 2003). Uma vez fosforilados em serina pela JNK a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via (ver esquema figura 2).

Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B (Shoelson *et al.*, 2003). Esta via pode ser ativada pelo TNF- $\alpha$ , mas também por outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  (Shoelson *et al.*, 2003). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo IkB/NFkB mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata (ver esquema figura 2). A inibição da ativação da via IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B com uso do anti-inflamatório ácido acetil salicílico (AAS)

reverte a resistência à insulina induzida por sinais pró-inflamatórios ou por sepse (Yuan *et al.*, 2001b; Shoelson *et al.*, 2003; Barreiro *et al.*, 2004).



Figura 2- As vias inflamatórias podem ser ativadas por citocinas, como o TNFα. Sinais provenientes destes mediadores convergem para vias de sinalização inflamatórias, incluindo as kinases IKK e JNK. Estas vias levam a produção de outros mediadores inflamatórios através do controle da transcrição gênica, bem como a inibição da sinalização da insulina.

Tais achados estabeleceram uma ligação molecular entre o aumento da massa adiposa com a obesidade e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus. Por esse motivo, resolvemos investigar em nosso modelo de destreinamento a real participação do tecido adiposo em orquestrar ações metabólicas que resultam em prejuízos a ação da insulina.

#### 1.6- Obesidade, Diabetes e disfunção mitocondrial

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais. São as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para a forma de energia química necessária para os processos celulares. Este processo de conversão de energia de óxido redução em energia química na forma de ATP é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintetase localizada na membrana mitocondrial interna.

Com papel chave no metabolismo essas organelas tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores, já que alterações na funcionalidade delas têm sido associadas ao ganho de peso, obesidade, diabetes, entre outras doenças. Tem sido encontradas alterações mitocôndriais em modelos animais de obesidade e diabetes, no entanto, em situação de destreinamento não está claro o envolvimento desta organela com o ganho de peso e resistência à insulina (Kelley et al., 2002; Petersen et al., 2004; Schrauwen-Hinderling et al., 2007). Algumas alterações metabólicas foram encontradas em mitocôndrias que possuíam proteínas desacopladoras (UCPs). Esta proteína favorece a volta de prótons do espaço intermembrana para a matriz sem sintetizar ATP. Pesquisas recentes mostraram que camundongos que superexpressam UCP-3 no músculo são resistentes à obesidade e ao diabetes induzidos por dieta (Schrauwen & Hesselink, 2004). Assim, parece que estas proteínas desempenham papel importante sobre o metabolismo e dispêndio energético. O tipo de exercício físico e de dieta parece modular a expressão e atividade destas proteínas. O exercício aeróbio exerce uma *downregulation* enquanto a dieta rica em lipídes uma upregulation da expressão de UCP-3 no músculo esquelético (Millet et al., 1997; Boss et al., 1998). Portanto, estas proteínas são importantes ao metabolismo corporal e no funcionamento da mitocôndria e podem estar envolvidas com o ganho de peso e acréscimo de gordura corporal adquiridos com o destreinamento.
# 1.6.1- Proteínas desacopladoras mitocôndriais (UCPs)

As proteínas desacopladoras (UCPs) localizam-se na membrana interna da mitocôndria e têm função de translocação dos prótons e elétrons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria (Rousset et al., 2004).

No processo de síntese de trifosfato de adenosina (ATP), a cadeia respiratória transporta prótons e elétrons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas, criando um gradiente de prótons. No retorno dos prótons para a matriz mitocondrial, as proteínas ATP-sintases, numa reação acoplada, utilizam a energia para fosforilar o ADP (+ Pi) e sintetizar o ATP. Assim como a ATP-sintase, a UCP também está localizada na membrana interna e serve como um canal alternativo para que os prótons atravessem de volta a matriz (Rousset et al., 2004). Quando a UCP é estimulada, a energia não é aproveitada para fosforilação do ADP, gerando apenas calor. A ativação desse caminho de translocação de prótons para a matriz mitocondrial resulta, indiretamente, em maior oxidação de substratos energéticos, diminuindo a eficiência da síntese de ATP e produzindo mais calor, com implicações na regulação da temperatura, do gasto energético e do peso corporal.

# 1.6.2- Identificação e Localização das UCPs

A primeira proteína desacopladora foi descoberta por Ricquier e Kader (Ricquier & Kader, 1976). A UCP-1 acelera muitas vezes o retorno de prótons para a matriz mitocondrial, fazendo com que a maior parte da energia proveniente do ciclo de Krebs e, por conseguinte, da oxidação dos substratos energéticos, seja perdida na forma de calor. A UCP-1 está associada com a termogênese do tecido adiposo marrom (TAM) (Klingenberg, 1999) e foi encontrada exclusivamente neste tecido. O TAM está presente em todos os mamíferos pequenos e recém-nascidos de mamíferos maiores, inclusive humanos (Dulloo & Samec, 2000). Por ser menos abundante em grandes mamíferos adultos, seu papel é menos relevante. No entanto, em pequenos roedores, a gordura marrom

é fundamental para a manutenção da temperatura corporal durante exposição ao frio. Por exemplo, animais com *knockout* do gene da UCP-1 ou destruição programada da gordura marrom apresentam hipotermia e intolerância ao frio (Lowell *et al.*, 1993). O funcionamento deste tecido é regulado pela noradrenalina, liberada pelos numerosos terminais simpáticos nesse tecido, mas pode ser influenciado por outros hormônios (ex. hormônios tireóideos) ou fatores metabólicos (ex. ácidos graxos) (Boss *et al.*, 2000).

No final da década de 90 duas novas isoformas de UCPs foram identificadas: UCP-2 e UCP-3. De natureza homologa à UCP-1, estas duas novas isoformas parecem funcionar como desacopladoras da fosforilação oxidativa, mas com distribuição em tecidos diferentes da UCP-1 (Gimeno et al., 1997; Muzzin et al., 1999). A UCP-2 é expressada no músculo esquelético de humanos, coração placenta, pulmão, figado, rins, pâncreas e tecido adiposo branco (Bao et al., 1998). A UCP-3, principalmente no músculo esquelético em humanos e no tecido adiposo marrom e músculo esquelético em roedores (Klingenberg, 1999). Desde que o músculo esquelético e o TAM são considerados importantes locais para o gasto de energia em humanos e roedores, respectivamente, a importante termogênese UCP-3 pode ser um mediador da adaptativa (Vidal-Puig et al., 1997). A isoforma UCP-4 que é menos similar a UCP-1 foi encontrada em mitocôndrias do cérebro, no entanto, seu papel nesse tecido ainda foi pouco explorada (Boss et al., 1997).

Consideradas descobertas importantes, a clonagem da UCP-2 e UCP-3 têm produzido entusiasmo, devido à hipótese de que, semelhantemente á UCP-1 no TAM, estas UCPs homólogas podem ser mediadoras da termogênese adaptativa em outros tecidos e responsáveis pela oxidação do excesso de energia consumido (Nordfors *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 2000). Além disso, há estudos demonstrando a importância das UCPs no controle da geração de radicais livres, principalmente quando há aumento dos processos oxidativos mitocôndriais (Nordfors *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que a UCP-3 no músculo esquelético têm um papel termogênico, com uma possível perspectiva de atuar no controle do peso corporal. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo principalmente em modelos de obesidade adquirida com o destreinamento ainda não foram descritos.

1.6.3- UCP-3 e sua relação com a obesidade

Devido ao fato de a UCP funcionar como dissipadora da energia (sob a forma de calor) que seria utilizada para ressíntese do ATP, indiretamente ela provoca maior consumo de substratos energéticos. A descoberta de sua presença em uma grande variedade de tecidos, além do TAM, trouxe grandes perspectivas em relação ao seu possível papel na etiologia da obesidade. Acredita-se que a UCP funcione como um ciclo fútil de prótons, pois como há diminuição da eficiência da síntese de ATP, ocorre aumento do catabolismo dos nutrientes como forma de manter a repleção do ATP. O possível papel no controle do gasto energético foi confirmada por pesquisadores, que estabeleceram relações entre UCPs com a obesidade, como, por exemplo, a diminuição da expressão gênica da UCP-2 em músculos abdominais (Nordfors *et al.*, 1998) e a correlação inversa entre a expressão gênica da UCP-3 e o índice de massa corporal (Schrauwen *et al.*, 1999).

O tecido adiposo branco e o muscular esquelético são os dois mais abundantes tecidos corporais, porém apenas o tecido muscular desempenha papel significativo na ternogênese nos mamíferos adultos. Deste modo, a identificação da UCP-3 produziu um grande interesse, associado às pesquisas sobre obesidade, pois a UCP-3 é constitutivamente expressada no tecido muscular. Foi demonstrado que a expressão gênica da UCP-3 está diminuída na obesidade, em camundongos e ratos Wistar obesos (Bao *et al.*, 1998; Diehl & Hoek, 1999). Em ratos Zucker obesos, foi verificada diminuição na expressão do RNAm da UCP-3 no TAM e no músculo sóleo, quando comparados com ratos magros (Muzzin *et al.*, 1999).

# 1.6.4- Papel da UCP-3 no músculo esquelético

A UCP-3 expressa especificamente no tecido muscular e no TAM, está relacionada com o consumo de substratos energéticos e também com o controle do peso corporal, sendo regulada pela disponibilidade e metabolismo de substratos energéticos como lipídios e glicose (Ricquier & Bouillaud, 2000). A entrada desses substratos no músculo resulta no aumento da expressão da UCP-3, levando ao aumento do gasto

energético. Desde que o músculo esquelético e o TAM são considerados importantes locais para o gasto de energia em humanos e roedores, a UCP-3 pode ser um importante mediador da termogênese adaptativa (Margareto *et al.*, 2001; Bachman *et al.*, 2002).

O processo de termogênese não é induzido somente por exposição ao frio e hibernação em algumas espécies, mas também por uma variedade de situações fisiológicas e fisiopatológicas como jejum, consumo alimentar, exercício físico (agudo e crônico), hipo e hipertireoidismo (Samec et al., 2002; Thompson & Kim, 2004).

Em estados de jejum, infecção e câncer, por exemplo, quando a concentração de ácidos graxos circulantes está elevada, a expressão gênica de UCP-3 também aumenta comparativamente ao estado de homeostase. Essa observação encontrada num estudo de Argilés et al. (Argiles *et al.*, 2002), indica que a UCP-3 e, possivelmente, a UCP-2, pode fazer parte de um mecanismo de proteção celular contra as conseqüências do metabolismo aumentado de substratos lipídicos e da estocagem excessiva de gordura, ou seja, a obesidade.

Tal tentativa de analogia e interpretação pode ser reforçada pelos estudos de Samec e colaboradores e de Schrauwen e colaboradores, com animais em jejum prolongado demonstraram aumento da expressão da UCP-2 e da UCP-3 em músculo esquelético (Samec *et al.*, 1998; Schrauwen *et al.*, 1999). Weigle e colaboradores acreditam que tal efeito esteja relacionado à maior concentração plasmática de ácidos graxos e sua utilização no metabolismo energético, já que numa situação como o jejum, o aumento da dissipação de energia pelo organismo seria paradoxal (Weigle *et al.*, 1998). As mesmas considerações foram feitas por Pedersen et al. quando investigaram tal fenômeno em humanos (Pedersen et al., 2000).

Ricquier e Bouillaud demonstraram as possibilidades de transporte de prótons para a matriz mitocondrial envolvendo a UCP e ácidos graxos. Uma delas é o transporte dos prótons em conjunto com ácidos graxos (na forma protonada R-COOH) também através da UCP, porém em maior taxa, mesmo quando da existência de baixas concentrações de ácidos graxos. Numa outra situação de elevada concentração de ácidos graxos, esses também transportariam os prótons para a matriz mitocondrial, porém nesse mecanismo o papel da UCP seria de transporte reverso da forma aniônica dos ácidos graxos (R-COO<sup>-</sup>) para fora da mitocôndria (Ricquier & Bouillaud, 2000).

Nesse contexto, o músculo esquelético, com sua intensa taxa metabólica e elevada capacidade de oxidação dos ácidos graxos, podem depender do papel da UCP-3 no transporte dos ânions de ácidos graxos para minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica. A regulação da atividade da UCP-3, portanto, se daria por meio da concentração intracelular de ácidos graxos e sua entrada nas mitocôndrias, tendo conseqüências não apenas na eficiência da ressíntese do ATP (e geração de calor), mas também na eficiência de parte dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, ao quais as células musculares estão especialmente susceptíveis durante exercícios prolongados exaustivos (ver esquema figura 3).



Figura 3- Representação esquemática da oxidação dos ácidos graxos e retorno dos prótons (H<sup>+</sup>) e elétrons (e<sup>-</sup>) para a matriz mitocondrial. Dentro da mitocôndria os ácidos graxos são oxidados nas reações da β-oxidação (β-Ox) e ciclo de Krebs (CK), liberando os H<sup>+</sup> e e<sup>-</sup> que são carreados (NADH+H<sup>+</sup> e FADH<sub>2</sub>) até a cadeia respiratória (1). O gradiente H<sup>+</sup> e e<sup>-</sup> entre o espaço intermembranas e a matriz determina seu retorno, passando pela proteína ATP sintase (2) com síntese de ATP (reação acoplada) ou pela proteína desacopladora (3) com produção de calor.

Outra situação associada com o aumento da expressão de UCP-3 é a ingestão de dieta rica em lipídes. O consumo deste tipo de alimento durante quatro semanas resulta em elevada concentração plasmática de ácidos graxos, levando a mudança no metabolismo lipídico e estimulando o aumento na expressão gênica de UCP-3. Interessantemente, em períodos mais prolongados com tal dieta, a concentração plasmática de ácidos graxos não mais altera e a expressão gênica da UCP-3 permanece se estabilizada (Schrauwen et al., 2002).

O papel das UCP-2 e UCP-3 no músculo esquelético ainda não esta completamente entendida e discute-se a possibilidade de ambas mediarem a termogênese ou regular a oxidação de lipídios, principalmente quando se tem elevada disponibilidade e baixa demanda desse combustível (Samec et al., 1999; Noland et al., 2003).

1.6.5- UCP-3 e o exercício físico (crônico e agudo)

O músculo esquelético representa 40% da massa corporal total do nosso organismo e exerce papel primordial no metabolismo de glicose e é responsável por 30% do dispêndio energético (Ricquier & Bouillaud, 2000). Além da sua abundância, o tecido muscular é particularmente interessante devido a sua ampla variação no grau de ativação, desde a inatividade até a atividade máxima durante a contração muscular intensa. Por isso, o exercício agudo (única sessão) e o crônico (treinamento) podem ser moduladores da expressão gênica e atividade das UCPs (Schrauwen & Hesselink, 2003).

Boss e colaboradores evidenciaram que ratos treinados apresentam uma diminuição de 60% e 76% na expressão gênica de UCP-3 nos músculos sóleo e tibial anterior, respectivamente (Boss et al., 2000). Os autores sugerem que tal adaptação ocorre devido a maior demanda energética imposta pela contração muscular, e isso, obriga os músculos a se adaptarem para tornar mais eficiente a ressíntese de ATP. O interessante é que tal mudança parece permanecer após o exercício físico. Um grupo de pesquisadores procurou investigar a expressão do RNAm da UCP-2 e da UCP-3 no período de recuperação após oito semanas de treinamento com ratos e encontraram diminuição da expressão dessas proteínas em ambos os músculos sóleo e tibial anterior (Boss *et al.*, 1998). Tal adaptação favorece o armazenamento de substratos energéticos no período de recuperação e proporciona melhor capacidade de trabalho em exercícios subseqüentes. Este efeito do treinamento na expressão de RNAm da UCP-2 e UCP-3 foi mais significativo no músculo tibial anterior (fibras de contração rápida, tipo IIa e IIb) em comparação ao músculo sóleo (fibras de contração lenta, tipo I), o que leva a sugerir que os músculos que dependem mais de glicose do que a oxidação de ácidos graxos para seu fornecimento de ATP ganham maior eficiência energética com o treinamento. Analogamente, a estes resultados, Schrauwen e Hesselink encontraram uma concentração 46% menor da UCP-3 em indivíduos submetidos a treinamento de *endurance* em comparação a indivíduos sedentários (Schrauwen et al., 2005) (ver esquema figura 4 B).

Em contrapartida alguns estudos que procuram investigar os efeitos de uma única sessão de exercício físico encontraram aumento na expressão do RNAm da UCP-3. Tsuboyama-Kasaoka e colaboradores verificaram aumento na expressão de UCP-3 no músculo de ratos três horas após o exercício de natação de uma hora, retornando ao estado basal 22 horas após o esforço físico (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 1998). Resultado semelhante foi encontrado por Cortright e colaboradores que realizaram experimento com ratos exercitados durante uma hora em esteira e observaram que a expressão de RNAm da UCP-3 estava elevada 63% em músculos vermelhos e 252% em músculos brancos, imediatamente após o exercício (Cortright *et al.*, 1999) (ver esquema figura 4 A). Segundo estes autores, tais diferenças entre o exercício agudo e crônico possivelmente esteja relacionado a dois fatores: a) maior consumo de oxigênio e gasto energético que ocorre durante período prolongado de recuperação e b) aumento da concentração de AGL e da oxidação nos músculos.



Figura 4- Representação esquemática da atividade das proteínas carreadoras da membrana mitocondrial, a ATP sintase (ATP-S) e a proteína desacopladora (UCP), em diferentes condições metabólicas. Nas setas de retorno dos H<sup>+</sup> e e<sup>-</sup> para a matriz a espessura representa a taxa de atividade das proteínas. A) nas condições listadas há aumento da concentração e oxidação dos ácidos graxos, maior expressão e atividade da UCP, B) no treinamento físico ocorrem adaptações celulares diversas para aumentar a eficiência de síntese do ATP, sendo também reduzida a expressão e atividade da UCP. (ME = matriz externa e MI = matriz interna da mitocôndria).

Assim, parece evidente que o conteúdo lipídico exerce função importante na expressão destas proteínas mitocôndriais. Além disso, tem sido reportado nos últimos anos que o conteúdo de triglicerídeos intramuscular (TGIM) desempenha papel importante no desenvolvimento de resistência à insulina no músculo (He *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2002; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2007) Por esse motivo, resolvemos em breve discussão reportar a participação da UCP-3 no metabolismo de ácidos graxos e o papel destes lipídeos como fatores relacionados com a etiologia do diabetes.

1.6.6- UCP-3 e metabolismo de ácidos graxos

Evidências científicas recentes mostram que a UCP-3 exerce papel importante no metabolismo de ácidos graxos (AG) (Bézaire et al., 2007). O primeiro papel específico para a UCP-3 no metabolismo de AG foi hipotetizado por Hagen e Harper, que apresentaram a idéia de que a UCP-3 numa situação aumentada de fluxo de AG para mitocôndria teria participação importante modulando a oxidação desse metabólito (Hagen & Harper, 2001). Segundo os autores o acúmulo de AG de cadeia longa ligado a coenzima A (AGCL-CoA) na matriz mitocondrial, seqüestrando e limitando a função da coenzima A (CoA), diminui parcialmente a oxidação desse metabólito, levando ao aumento da expressão das UCPs no músculo. A hipótese é de que a UCP-3 em conjunto com a tiosterase mitocondrial (MTE-1) liberaria a CoA e exportaria o ânion AG. A exportação do ânion AG da matriz pela UCP-3 pode não só melhorar a oxidação dos AG como também reduzir o potencial de membrana e por meio disso amenizar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 5).

Além disso, Schrauwen e colabordores, independente da hipótese da translocação de AG através da UCP-3, acreditam que o elevado fluxo de AG na mitocôndria favorece a peroxidação lipídica, fragilizando a célula (Schrauwen et al., 2001). Quando o suplemento de ácidos graxos excede a capacidade oxidadtiva, uma grande parte dos AG entra na matriz via um mecanismo transmembrana, independente do sistema carnitil pamitoil transferase (CPT), conhecido como movimento "flip-flop" do AG. Esse AG pode não ser metabolizado pela ausência de Acil-CoA sintase na matriz da mitocôndria. Esse acúmulo de AG na matriz aumenta o risco de peroxidação lipidíca mitocondrial, e o refluxo de AG mediadada pela UCP-3 talvez possa proteger contra esse dano (Figura 5).

Desse modo, a UCP-3 pode ter participação importante no acúmulo de triglicerídeos intramuscular (TGIM). Tal hipótese pode ser reforçada por estudos que mostraram que camundongos que superexpressavam UCP-3 tiveram os estoques de TGIM citosólicos diminuídos. Por outro lado, observam-se prejuízos na capacidade de oxidação de AG na ausência de UCP-3 (Vidal-Puig et al., 2000; Bezaire et al., 2005; Hocks et al., 2006).



Figura 5- Hipóteses da função da UCP-3. A UCP-3 remove o AGCL da matriz para o espaço intermembrana para a reativação deste pela acil-coenzima A sintase, liberando a CoA da matriz, uma enzima limitante para a β-oxidação e ciclo de Krebs. Portanto a UCP-3 tem o propósito de facilitar a oxidação de ácidos graxos. Além disso, a presença de AG na matriz pode sofrer ação de ERO e isso pode resultar na peroxidação lipídica da membrana mitocondrial. A hipótese é de que a UCP-3 diminuindo o potencial de membrana mitocondrial diminua a produção de ERO. ACS, acil-coenzima A sintase; MET-1, mitocondrial tiosterase 1; β-ox, beta-oxidação; AGCL, ácido graxo de cadeia longa; SOD, superóxido desmutase; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superóxido; OH<sup>-</sup>, hidroxila; CPT, carnitina palmitoil transferase; ERO, espécies reativas de oxigênio.

# 1.6.7- Conteúdo de triglicerídeos intramuscular (TGIM) e diabetes do tipo 2

O aumento nos níveis de TGIM e a diminuição de enzimas oxidativas têm sido reportadas em músculo esquelético de pacientes diabéticos (He et al., 2001). Nos últimos anos, novos dados têm apontado para o papel central da disfunção mitocondrial no desenvolvimento de resistência à insulina muscular (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). Tal hipótese foi levantada, pois se verificou que a disfunção mitocondrial pode ser a razão para o aumento do conteúdo de TGIM e seus metabólitos. A acumulação destes metabólitos (ceramidas e diacilgliceróis) é um estímulo disparador da cascata de serina/treonina quinases, possivelmente envolvendo as proteínas PKC, IKK-β e JNK. Estas provocam a fosforilação em serina do IRS-1 e menor ativação da PI 3-q, resultando em redução no transporte de glicose estimulada por insulina (ver esquema figura 6) (Petersen et al., 2004; Savage et al., 2005). Pesquisa inovadora, através de ressonância magnética do músculo, identificou que existe correlação entre a diminuição na função mitocondrial e o aumento do conteúdo de TGIM com o risco de pessoas saudáveis desenvolverem diabetes (Petersen et al., 2004). Além disso, reduzida função mitocondrial e aumento nos níveis de TGIM tem sido encontradas em pessoas idosas insulino-resistentes (Petersen et al., 2003). Estes estudos sugerem que a diminuição na função mitocondrial e o aumento no conteúdo de TGIM podem ser fatores de risco primários para o desenvolvimento do diabetes. É possível que animais treinados que apresentam uma diminuição na expressão de UCP-3 com o cessamento do treinamento possam apresentar maior conteúdo de TGIM. Como dito anteriormente, a UCP-3 parece exercer papel importante na oxidação de ácidos graxos, uma vez que animais que superexpressam essa proteína apresentam menor acúmulo de TGIM, e são resistentes a obesidade e ao diabetes quando submetidos a uma dieta rica em lipídes. Além disso, a perda da eficiência na capacidade oxidativa adquirida com os exercícios pode resultar em uma menor oxidação de ácidos graxos, o que também pode contribuir no aumento desse substrato no músculo esquelético e induzir resistência à insulina.



Figura 6- Mecanismo de resistência à insulina induzido por ácidos graxos mitocôndriais. A acumulação dos metabólitos dos ácidos graxos (Acil-CoA e diacilgliceróis-DAG) provoca a ativação de proteínas serina/treonina quinases, possivelmente envolvendo as proteínas PKC, IKK-β e JNK. Estas provocam a fosforilação em serina do IRS-1 e menor ativação da PI 3-q, resultando em redução no transporte de glicose estimulada por insulina.

Apesar do acúmulo progressivo de informações a respeito da biologia molecular da obesidade e diabetes, ainda existem grandes lacunas a serem preenchidas. Observa-se, que a literatura ainda é escassa quanto ao assunto destreinamento. Apesar de uma evidente relação do processo de destreinamento com o desenvolvimento da obesidade e resistência á insulina, que pode evoluir para o diabetes, poucos são os estudos que trouxeram dados conclusivos para melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dessas doenças nesse período. Como discutido anteriormente, diversos aspectos estão relacionados à progressão da obesidade e uma vez desvendados poderão determinar as medidas preventivas contra o aparecimento de doenças no destreinamento.

# 2- OBJETIVOS

Diante dos estudos encontrados na literatura, verifica-se a necessidade de realização de trabalhos que esclareçam os mecanismos envolvidos com a obesidade e resistência à insulina com o destreinamento. A obesidade e a resistência à insulina têm alta prevalência no mundo todo e estão relacionadas a grande morbi-mortalidade; a via inflamatória tem implicação etiopatogênica tanto na obesidade quanto na resistência à insulina, regulando negativamente a via de sinalização da insulina. A via da JNK e do IKK faz parte da via inflamatória que prejudica a ação da insulina e, portanto são proteínas importantes de sinalização celular relacionado à resistência à insulina. Além disso, a participação da UCP-3 mitocondrial no dispêndio energético em músculo esquelético, parece exercer papel importante no desenvolvimento da obesidade. Assim,

Foram objetivos deste estudo:

- 1. Avaliar o comportamento alimentar, o ganho de peso e de gordura corporal e a sensibilidade periférica à insulina no período de destreinamento.
- Avaliar as alterações nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina (via IRSs/PI 3-quinse/Akt) após cessamento do exercício físico nos tecidos adiposo branco, muscular esquelético e hepático.
- Analisar a expressão das proteínas da via CAP/Cbl em tecido adiposo branco e a possível contribuição destas ao ganho de peso corporal e acréscimo de massa adiposa no período de destreinamento.
- Avaliar a expressão de proteínas da via inflamatória, JNK e IkB em tecido adiposo branco, muscular esquelético e hepático de ratos sedentários e destreinados submetidos a uma dieta hiperlipídica.
- 5. Investigar a atividade das UCPs e a expressão de UCP-3 em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético dos animais.
- Por fim, determinar o conteúdo de triglicerídeos no músculo esquelético (TGIM) dos animais.

# **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1- Animais experimentais e protocolos de pesquisa

Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com os princípios e procedimentos de cuidado com o uso de animais experimentais e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em ciclos de luz artificial de 12 horas claro e 12 horas escuro e alocados em gaiolas individuais. Aleatoriamente, os ratos foram divididos em 4 grupos experimentais com similar peso corporal  $(250 \pm 5g)$ : Grupo Controle (C), composto por ratos Wistar alimentados com ração padrão para roedores (C); grupo sedentário dieta hiperlipídica (S-DHL), composto por ratos Wistar alimentados com dieta padrão para roedores (semanas 1-8) e alimentados com uma dieta hiperlipídica (semanas 9-16); grupo destreinado dieta hiperlipídica (D-DHL), composto por ratos Wistar alimentados com dieta padrão e submetidos a um programa de treinamento de natação (semanas 1-8) e posteriormente, foram destreinados e alimentados com uma dieta hiperlipídica (semanas 9-16); grupo destreinado dieta padrão (D-DC), composto por ratos alimentados com dieta padrão e submetidos a um programa de treinamento de natação (semanas 1-8) e posteriormente foram destreinados com manutenção da dieta padrão para roedores (semanas 9-16). Para melhor entendimento da divisão dos grupos e do protocolo experimental segue abaixo quadro 1 explicativo.

Quadro 1- Protocolo experimental. Na fase experimental 1 todos os grupos foram alimentados com a dieta padrão para roedores. O diferencial nessa fase foi o treinamento de natação, que foi realizado pelos grupos D-DHL e D-DC. Na fase experimental 2 houve a interrupção do programa de exercícios e os animais do grupo D-DHL e S-DHL foram submetidos a uma dieta hiperlipídica. Os grupos controle e D-DC permaneceram em dieta padrão.



#### 3.2- Programa de exercício físico

O protocolo de exercício consistiu de natação, em grupos de 4 a 5 animais, realizado em baldes plásticos com diâmetro interno de 60 cm e com uma profundidade de 100 cm. A temperatura da água foi mantida entre 34 °C e 35 °C, por ser considerada termicamente neutra aos animais. Os grupos D-DHL e D-DC nadaram 1 hora/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas, suportando uma carga que foi progressivamente aumentada de 2,5% para 5% do peso corporal (ver esquema Quadro. 2). A sobrecarga foi presa à cauda e ajustada de acordo com o peso do animal na semana. O programa de natação persistiu por 8 semanas (semanas 1-8) e subsequentemente houve a interrupção do treinamento (período de destreinamento) da 9° a 16° semana. O referido programa de treinamento tem sido caracterizado previamente como sendo de baixa a moderada intensidade e de longa duração devido à melhora na capacidade oxidativa do músculo e pouco efeito estressor ao organismo (Medeiros et al., 2000; Luciano et al., 2002; Voltarelli et al., 2002; Pauli et al., 2006).





# 3.3- Determinação da massa corporal

A massa corporal foi determinada através de balança de precisão, sempre no início de cada semana e ao final do experimento após anestesia dos animais.

# 3.4- Determinação da ingestão alimentar

O conteúdo de ração ingerida foi avaliada semanalmente pesando-se a ração antes e após 24 horas (12:00 h da manhã as 12:00 horas da manhã). Este procedimento foi feito 3 vezes por semana. Desse modo, tivemos ao final de cada semana a média da ingestão de cada animal. Obtendo com a somatória das médias de cada animal, a média de ingestão alimentar de cada grupo semanalmente.

#### 3.5- Determinação do peso da massa de gordura epididimal e perirenal

Após anestesia o tecido adiposo epididimal e perirenal foram cuidadosamente dissecado e pesado em balança analítica de alta precisão.

# 3.6- Determinação da glicose plasmática

A dosagem da glicose plasmática foi realizada pelo método enzimático colorimétrico de glicose oxidase.

# 3.7- Determinação da insulina

A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada por radioimunoensaio.

# 3.8- Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

O teste foi realizado após os 60 dias de experimento. Os animais permaneceram em jejum por 8 horas e em seguida fez-se a coleta de sangue correspondente ao tempo 0 do teste. Em seguida, foi realizada a injeção de uma solução de glicose 20% (2g/kg de peso corporal) administrada intraperitoneamente com posterior coleta de amostras de sangue nos tempos 15, 30, 60, 120 minutos, para as dosagens de glicose e insulina. A insulina foi posteriormente dosada por radioimunoensaio.

# 3.9- Teste de tolerância intraperitoneal à insulina

Os testes foram realizados sempre respeitando um jejum de 8 horas. O primeiro teste aconteceu 36 horas após a última sessão de treino, e os demais no 7°, 15°, 30° e 60° dias de experimento. Após isso, a insulina (1.5 UI/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 decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a formula  $0,693/t_{1/2}$ . 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.

#### 3.10- Determinação do Índice Homa

Turner e colaboradores desenvolveram um modelo matemático que prediz a sensibilidade à insulina pela simples medida da glicemia e insulina de jejum (Matthews et al., 1985). Este método foi chamado de HOMA e dele se extrai o índice HOMA-IR, que visa traduzir a sensibilidade à insulina. Eles se basearam em dados da literatura para construir curvas relacionando glicemia e estado de homeostase (em inglês: stady-state plasma glucose, ou SSPG), com a resposta insulínica. Em resumo, o modelo prediz uma insulinemia e glicemia para uma data sensibilidade à insulina. Inversamente, se conhecidas simultaneamente a glicemia e a insulinemia, o modelo pode fornecer o índice Homa-IR pela seguinte equação:

**HOMA-IR** = glicemia (mMOL) x insulina (Mu/mL)  $\div$  22,5

#### 3.11- Sacrifício dos animais e extração dos tecidos

Após 8 horas de jejum, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente, com tiopental sódico (80 mg/kg de peso corporal) e a perda dos reflexos pedal e córneano foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e 60 µg de insulina ou salina foram injetadas na veia porta. Após 30 s, o fígado foi removido e imediatamente homogeneizado em tampão específico contendo 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C, usando um polytron (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em máxima velocidade por 30 s. Aproximadamente 90 s depois da infusão de insulina ou salina, fragmentos do músculo gastrocnêmio e da gordura epididimal foram retirados e homogeneizados como descrito

acima. Em todas as amostras foi adicionado triton X-100 1% e as mesmas permaneceram no gelo por 40 minutos. O material extraído foi então centrifugado na velocidade de 11000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto e outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos. As técnicas de imunoprecipitação e imunoblot serão descritas a seguir.

## 3.12- Imunoprecipitação

Adicionaram-se as amostras anticorpos específicos para imunoprecipitação. A incubação permaneceu em constante agitação por um período de 12 horas. Em seguida, os imunocomplexos foram recuperados com Proteina A Sepharose 6 MB por 2 horas à 4°C e decantados por centrifugação por 15 minutos à 4°C/11000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas (imunocomplexos). Adicionou-se Laemmli acrescido de DTT e após rápida fervura de 5 minutos as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE).

## 3.13- Imunoblot

Após determinação de proteína de cada amostra (extrato total), estes foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT. Assim como os imunocomplexos, houve rápida fervura das amostras que e em seguida 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 especifico. 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 sinal foi detectado por tratamento com 2  $\mu$ Ci de [<sup>125</sup>I] Proteina A (30  $\mu$ Ci/ $\mu$ g) em 10 mL de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente (20 °C) e exposição a filmes de RX Kodak à -80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas nas auto-radiografias foram quantificadas através de densitometria.

#### 3.14- Reagentes químicos, tampões e anticorpos

Os anticorpos e as substâncias químicas utilizadas no experimento foram descritas a seguir. Os anticorpos, anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -PY), anti-IR $\beta$  ( $\alpha$ -IR), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-IRS-3, anti-c-Cbl ( $\alpha$ -Cbl), anti-CAP ( $\alpha$ -CAP), anti-Akt <sup>1</sup>/<sub>2</sub>, anti-phospho-C3G, anti-GLUT4, anti-JNK, anti-phospho-JNK, anti-phospho-c-Jun, anti-IkB $\alpha$ , anti-UCP-3, foram provenientes da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo, anti-phospho-Akt [ser 473] foi da Cell Signaling Technology (Beverly. MA, USA). A subunidade p85 da PI 3q foi da Upstate Biotechnology (Upstate Biotechnology, NY, USA). Insulina recombinante humana foi provida da Eli Lylli and Co. (Indianapolis, IN, USA). Reagentes químicos de rotina utilizados foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

#### 3.15- Isolamento de mitocôndrias do músculo esquelético

Mitocôndrias foram isoladas do músculo esquelético dos membros posteriores de ratos Wistar S-DHL e D-DHL utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo (Tonkonogi & Sallhin, 1997). O tecido muscular esquelético, retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, foi lavado em solução de sacarose 100 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, EGTA 0.1 mM e BSA 0.2% (4°C), picado com tesoura e homogeneizado (*10 strokes*) em homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogenato foi centrifugado a 800 xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi

centrifugado durante 10 minutos a 6000 xg sendo a fase lipídica flutuante retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso no mesmo meio e centrifugado a 6000 xg por 3 minutos. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por ml. A concentração de proteína das suspensões mitocôndriais foi determinada pelo método de biureto (Gornall et al., 1949), modificado pela adição de colato 1% (Kaplan & Pedersen, 1983). A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

#### 3.16- Procedimentos de Incubação Padrão

As mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio de reação padrão contendo Manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 10 mM ( $37^{\circ}$ C). Foram utilizadas mitocôndrias isoladas com controle respiratório acima de 3 e razão ADP/O acima de 2. FCCP (1 µM) foi adicionado para colapsar o potencial eletroquímico de H<sup>+</sup>. Onde indicado foi utilizado 2 µM rotenona (inibidor do Complexo I), 100 µM malonato (inibidor da captação de succinato),1µM carboxiatractilozídeo (CAT) (inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina (trocador ATP/ADP) e 2 mM GDP (inibidor das UCPs).

## 3.17- Medida do potencial elétrico transmembrana mitocondrial

A fluorescência da safranina O foi empregada como método para obtenção de um registro do potencial de membrana mitocondrial (Holden & Sze). Mudanças na fluorescência da safranina foram registradas em espectrofluorímetro da marca Hitachi F-4500 (Hitachi LTD., Tokyo, Japan) com excitação em 495 nm e emissão 586 nm e slit de 3 nm.

#### 3.18- Determinação do conteúdo de triglicerídeos Intramuscular

Amostras do tecido muscular foram analisadas usando o método previamente descrito e modificado de Folch et al (1957). Fatias do músculo gastrocnêmio foram pesadas e homogeneizadas manualmente, usando um volume de água destilada igual a 8 vezes o peso do tecido em miligramas. O protocolo de extração do triglicerídeos foi realizado como descrito a seguir: 5M NaCl, metanol e clorofórmio foram adicionado ao homogenado e misturado, e a fase ternária foi interrompida com água e clorofórmio após 5 minutos de incubação. A terceira fase então foi separada por centrifugação rápida (top speed). As fases aquosa e protéica foram reextraídas com 9:1 de solvente de lavagem clorofórmio-metanol e separado por centrifugação. O solvente orgânico foi secado usando-se gás nitrogênio com um N-Evap, e o triglicerídeo foi ressupendido em isopropanol contendo 2% de triton x-100. Foram utilizadas 2 ul da solução e o método enzimático colorimétrico para determinar as concentrações intramusculares de triglicérides seguindo as instruções do fabricante (Roche Diagnostic GmbH., Mannheim, Alemanha). Os triglicerídeos da amostra foram determinados após hidrólise enzimática com lipases. O indicador é a quinonimina formada a partir do peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol sob a influência catalítica da peroxidase. O ensaio foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

## 3.19- Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Quando comparado dois grupos, foi utilizado teste *t* de Student para dados não pareados. Quando necessário foi utilizada análise de variância e em seguida aplicação do teste post-hoc de Bonferroni, com nível de significância pré-fixado em P<0.05.

# 4- RESULTADOS

#### 4.1- Parâmetros fisiológicos e metabólicos

Na tabela 1 estão apresentados os dados comparativos dos grupos controle (C), sedentário dieta hiperlipídica (S-DHL), destreinado dieta hiperlipídica (D-DHL) e destreinado dieta padrão (D-DC) após os 60 dias de experimento com a dieta iperlipídica. Os grupos S-DHL e D-DHL tiveram maior ganho de peso quando comparados aos grupos controles (C e D-C). Entretanto, animais do grupo D-DHL tiveram um ganho de peso corporal significativamente superior em relação aos animais do grupo S-DHL ao final do experimento. Na análise sanguínea, verifica-se que o grupo de ratos D-DHL apresenta maior concentração de glicose basal do que o grupo de ratos controles. A concentração de insulina plasmática foi maior nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica (S-DHL e D-DHL) se comparada aos ratos controles (C e D-DC), e o mesmo aconteceu para a concentração de leptina. Porém, os animais do grupo D-DHL apresentaram concentrações maiores de leptina do que os animais do grupo S-DHL.

Parâmetros	Controle (n=8)	S-DHL (n=8)	D-DHL (n=8)	D-DC (n=8)
Peso corporal final (g)	375 ± 5,6	$446 \pm 7,4^{a,b,c}$	$481 \pm 7,5^{a,b}$	389 ± 5,8
Glicose sérica (mg/dL)	81.50 ± 5.50	87.50 ± 1.50	$98.60\pm2.02^{\text{a}}$	83.40 ± 2.12
Insulina sérica (ng/ml)	$2.54\pm0.10$	$3.12 \pm 0.11^{a,b}$	$3.56 \pm 0.21^{a,b}$	$2.42 \pm 0.12$
Leptina sérica (pg/ml) Resultados expressos como	$4.64 \pm 0.44$ média e erro	$21.06 \pm 6.00^{a,b,c}$ padrão da média de	$28.83 \pm 1.27^{a,b}$ n = 8 ratos. <sup>a</sup>	$5.00 \pm 0.73$ $\neq \text{ do controle;}$

Tabela 1- Parâmetros fisiológicos e metabólicos após 60 dias de dieta hiperlipídica.

<sup>b</sup>  $\neq$  do D-DC e <sup>C</sup>  $\neq$  do D-DHL, p<0,05.

#### 4.2- Características gerais dos animais após 60 dias de dieta hiperlipídica

Os dados laboratoriais encontrados em cada grupo após os 60 dias de experimento com a dieta hiperlipídica foram sumarizados na figura 1. Houve diferença significativa no peso corporal dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica em relação aos animais controles que foram alimentados somente com a dieta padrão. Além disso, nota-se que na 14°, 15° e 16° semanas os ratos D-DHL apresentaram peso corporal superior ao encontrado nos ratos S-DHL. Tal resultado demonstra que o destreinamento resulta em acréscimo maior de peso corporal quando comparado a ratos sedentários submetidos a uma dieta rica em lipídes (A). Quanto à média semanal de ingestão alimentar durante o experimento, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados. Portanto, o treinamento (semanas 1 a 8) (dados não mostrados) e o destreinamento (semanas 9 a 16) não promove mudanças significativas no comportamento alimentar (B).



Figura 1- Características gerais dos animais. Evolução do peso corporal em cada semana (A). Ingestão alimentar dos grupos experimentais em cada semana (B). Barras representam médias e erro padrão da média de n = 16 ratos. \* p<0.05 versus controle ou D-DC e <sup>#</sup>p<0.05 versus D-DHL. DC, dieta controle; DHL, dieta hiperlipídica.

Figura 1C. Durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) a concentração de glicose sanguínea nos ratos S-DHL e D-DHL foram constantemente maiores do que a concentração de glicose encontrada nos ratos controles (C e D-DC). A área sob a curva de glicose também foi significativamente maior para os ratos alimentados com a dieta hiperlipídica (S-DHL e D-DHL) quando comparadas aos grupos controles (C). Já os níveis de insulina foram maiores nos animais S-DHL e D-DHL no tempo 15 minutos do teste. Em relação aos tempos remanescentes não foram encontradas diferenças significativas na concentração de insulina entre os grupos estudados e, no entanto, a área sob a curva de glicose foram maiores para os grupos de ratos S-DHL e D-DHL se comparadas aos ratos controles (C e D-DC) (C).

C TTGip



Figura 1C- Características gerais dos animais. Dados referentes ao teste de tolerância à glicose após 60 dias da dieta hiperlipídica. Barras representam médias e erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle ou D-DC e ≠ p<0.05 versus D-DHL.</p>

No teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTIip), verifica-se que ocorre uma menor queda na taxa de decaimento da glicose em resposta à insulina nos animais que receberam a dieta hiperlipídica em relação aos outros animais que se alimentaram da dieta padrão no mesmo período. Além disso, houve um menor consumo de glicose no teste nos animais D-DHL quando comparado aos animais S-DHL (1D) e isso foi confirmado pelo aumento do índice HOMA neste grupo (1E). Estes resultados demonstram que os animais destreinados foram menos responsivos à insulina em relação aos demais grupos. Por fim, os animais S-DHL e D-DHL obtiveram maior ganho de gordura epididimal e perirenal quando comparado aos animais controles. Sendo que, o ganho de massa adiposa foi ainda maior nos animais D-DHL se comparado aos animais S-DHL (1F e G). Tal fato mostra que animais destreinados submetidos à dieta hiperlipídica tem um acréscimo de massa adiposa mais rápida do que seus pares sedentários.



Figura 1- Características gerais dos animais. Dados referentes ao teste de tolerância à insulina e peso de massa adiposa após 60 dias da dieta hiperlipídica. Barras representam médias e erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle ou D-DC  $e \neq p < 0.05$  versus D-DHL.

Após os resultados obtidos referentes as características fisiológicas e metabólicas (Tabela 1) e características gerias dos animais (Figura 1), fizemos uma análise molecular (expressão e fosforilação de algumas proteínas) após os animais serem submetidos a dieta hiperlipídica por 15 dias e 60 dias. Aos 15 dias o objetivo foi encontrar respostas primárias para explicar o ganho de peso e a diminuição na sensibilidade á insulina no início do destreinamento. Nesse contexto, estudamos o músculo esquelético que está envolvido tanto com o treinamento (contração muscular), como também no destreinamento (desuso). Como este tecido representa aproximadamente 40% da massa tecidual total do nosso corpo, tem importância tanto no metabolismo da glicose como para o dispêndio energético do organismo. Posteriormente, averiguamos as alterações aos 60 dias de dieta hiperlipídica, com intuito de desvendar as adaptações que acontecem mais tardiamente em nosso modelo experimental.

# 4.3- Dados fisiológicos e moleculares da ação da insulina após 15 dias de ingestão da dieta hiperlipídica.

Figura 2. No teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTIip) após 15 dias de ingestão da dieta hiperlipídica pelos animais, verifica-se que não há diferença significativa na taxa de decaimento da glicose entre os grupos estudados. No entanto, nota-se que há uma tendência de menor sensibilidade à insulina nos animais D-DHL em relação aos animais S-DHL (A). Tal resultado sugere que possíveis adaptações no início do destreinamento possam contribuir com essa tendência à menor captação de glicose nos animais D-DHL em relação aos animais SDHL. Em relação à fosforilação da Akt serina<sup>473</sup> estimulada por insulina, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os grupos para os diferentes tecidos (músculo, figado e tecido adiposo) (B, C e D). Semelhantes resultados aconteceram para fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, com a associação destes substratos com a PI 3-q (dados não mostrados). Portanto, a semelhança na fosforilação da Akt entre os grupos estudados é um dado representativo de que não houve mudanças na sinalização da insulina após 15 dias da ingestão da dieta hiperlipídica em comparação aos animais que se alimentaram da dieta padrão.



Figura 2- Dados fisiológicos e moleculares da ação da insulina após 15 dias de ingestão da dieta hiperlipídica. Dados referentes ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTIip) (A). Fosforilação da Akt serina<sup>473</sup> nos tecidos muscular, hepático e adiposo dos grupos experimentais (B, C e D). Dados representativos da análise das bandas autoradiografadas de 3 experimentos, avaliadas por densitometria através do programa Scion Image. Os dados foram normalizados de acordo com a média encontrada nos animais controles antes do estímulo com insulina. O grupo controle foi usado como referência comparativa para determinação dos resultados dos demais grupos. O sinal negativo (-) representa sem estímulo com insulina e o sinal positivo (+) com estímulo da insulina. Barras representam media e erro padrão da média de n = 8 ratos, p<0.05.

# 4.4- Acúmulo de triglicerídeos intramuscular (TGIM), expressão de UCP-3 e atividade das UCPs no músculo esquelético após 15 dias da ingestão da dieta hiperlipídica

Na figura 3A, verifica-se que os animais D-DHL tiveram maior concentração de TGIM quando comparado aos demais grupos estudados. A análise por imunoblot mostrou uma redução na quantidade de UCP-3 no músculo esquelético de ratos destreinados (D-DHL) (46%) em relação aos ratos sedentários (S-DHL) (B).



Figura 3- Análise da concentração de TGIM e da expressão da UCP-3 após 15 dias de dieta hiperlipídica. A concentração de TGIM foi avaliada de acordo com a técnica descrita em materiais e métodos (A). Extratos do tecido muscular foram imunoblotados com anticorpo anti-UCP-3 e analisadas como descritas em materiais e métodos (B). Barras representam media e erro padrão de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle e # p<0.05 versus D-DHL.</p>

Figura 3. Analisamos também a atividade das UCPs em mitocôndrias isoladas de músculos esqueléticos de ratos S-DHL e D-DHL através da análise do potencial eletroquímico de H<sup>+</sup> ( $\Delta\mu$ H<sup>+</sup>). Na figura 3C, a adição de mitocôndrias ao meio de reação na presença de substratos energéticos aumenta a fluorescência da Safranina, que é proporcional ao  $\Delta \mu H^+$ . Observamos que, na presença de ácidos graxos livres contaminantes (ausência de BSA) nas mitocôndrias de ratos S-DHL (linha pontilhada) o  $\Delta \mu H^+$  é ligeiramente menor que o  $\Delta \mu H^+$  das mitocôndrias de ratos D-DHL (linha contínua). A adição de ADP ao experimento, promove a diminuição do  $\Delta \mu H^+$  devido à captação de ADP pela mitocôndria para fosforilação oxidativa. Verificamos que o restabelecimento do  $\Delta \mu H^+$ após a adição de ADP ocorre mais rapidamente em mitocôndrias de ratos D-DHL quando comparadas às mitocôndrias de ratos S-DHL. Esses resultados indicam que as mitocôndrias de ratos D-DHL possuem uma capacidade de fosforilação oxidativa mais eficiente, o que pode ser resultado de uma menor atividade de UCPs nessas mitocôndrias.

Nas figuras 3D e 3E, observamos a atividade das UCPs de mitocôndrias de ratos S-DHL e D-DHL quando a Coenzima Q (CoQ) se encontra predominantemente em um estado mais oxidado pela presença de malonato, um inibidor da captação de succinato pela mitocôndria. De acordo com trabalhos prévios (Jarmuszkiewicz, et al., 2004), este protocolo promove oxidação da CoQ, com redução de aproximadamente 10% na velocidade de consumo de O<sub>2</sub> sem redução significante do  $\Delta \mu H^+$ . Observamos que, nestas condições, a adição de ácido linoleico (LA) ao meio de reação promove uma queda mais pronunciada no  $\Delta \mu H^+$  em mitocôndrias de ratos S-DHL (D) guando comparadas às mitocôndrias de ratos D-DHL (E). A presença de GDP, um inibidor das UCPs, impede que ocorra essa queda de  $\Delta \mu H^+$  induzida por LA em mitocôndrias de ratos S-DHL e não promove efeito significante no  $\Delta \mu H^+$  de mitocôndrias de ratos D-DHL. Esses resultados indicam que nas mitocôndrias de ratos D-DHL a atividade das UCPs está diminuída em relação as mitocôndrias de ratos S-DHL.



**Figura 3-** Análise da atividade das UCPs através do potencial de membrana mitocondrial após 15 dias de dieta hiperlipídica As mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão na presença de 5  $\mu$ M de safranina e 5 mM de substratos para o Complexo I (Piruvato, Malato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato) (C); 15 mM succinato, 2  $\mu$ M rotenona, 100  $\mu$ M malonato, 80 nM ATP e 1 $\mu$ M carboxiatractilozídeo (CAT) (D e E). Onde indicado foram adicionados 84  $\mu$ M de ADP, ácido linoleico 0,5  $\mu$ M, 2mM GDP e 1  $\mu$ M de FCCP. Em C, tempo de retorno do  $\Delta\mu$ H<sup>+</sup> após a adição de ADP: D-DHL (linha contínua) 133,6 ± 3,6 seg; S-DHL (linha tracejada): 183,5 ± 14,6 seg. Média ± erro padrão da média. p < 0,05. 4.5- Sinalização da insulina no fígado dos animais controles (C), sedentários alimentados com uma dieta hiperlipídica (S-DHL), destreinados alimentados com uma dieta hiperlipídica (D-DHL) e destreinados controle (D-DC) após 60 dias de dieta hiperlipídica.

Os resultados referentes ao efeito da dieta hiperlipídica nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina no figado foram apresentados na figura 4. Houve similar redução (40%-50%) nos níveis de fosforilação em tirosina induzidos por insulina do IR, IRS-1 e IRS-2 (A, B e D), na associação do IRS-1/PI 3-q e IRS-2/PI 3-q (C e E) e também na fosforilação em serina da Akt (F) nos animais S-DHL e D-DHL quando comparado com os animais controles.


Figura 4- Fatias do fígado extraídos dos ratos injetados com insulina ou salina foram preparadas como descritas em materiais e métodos e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos, anti-IRβ e imunoblotado (IB) com anti-fosfo-tirosina (PY) ou anti-IRβ (A). Extratos do fígado foram também IP com anticorpos, anti-IRS-1 e anti-IRS-2 e IB com anti-PY, anti-PI 3-q ou anti-IRS-1, anti-IRS-2, respectivamente (B, C, D e E). Por fim, extratos do tecido hepático foram IB com anticorpos, anti-fosfo-Akt e anti-Akt (F). Os dados foram normalizados de acordo com a média encontrada nos animais controles antes do estímulo com insulina. O grupo controle foi usado como referência comparativa para determinação dos resultados nos demais grupos e foram expressos como unidades arbitrárias. O sinal negativo (-) representa sem estímulo com insulina e o sinal positivo (+) com estímulo da insulina. Barras representam media e erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle e D-DC e # p<0.05 versus D-DHL.</p>

4.6- Sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio dos animais controles (C), sedentários alimentados com uma dieta hiperlipídica (S-DHL), destreinados alimentados com uma dieta hiperlipídica (D-DHL) e destreinados controle (D-DC) após 60 dias de dieta hiperlipídica.

A figura 5, trás os resultados referentes às conseqüências da dieta hiperlipídica nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina no músculo gastrocnêmio. Houve similar redução (40-50%), nos níveis de fosforilação em tirosina induzido por insulina do IR e IRS-2 (A e D), na associação do IRS-2/PI 3-q (E) nos grupos de animais S-DHL e D-DHL quando comparado com os animais controles. Por outro lado, nos animais D-DHL houve significativa redução no nível de fosforilação induzido por insulina do IRS-1, da associação do IRS-1/PI 3-q e da fosforilação da Akt comparado ao grupo de animais S-DHL (B, C e F).



Figura 5- Fatias do músculo extraídos dos ratos injetados com insulina ou salina foram preparadas como descritas em materiais e métodos e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos, anti-IRβ e imunoblotado (IB) com anti-fosfo-tirosina (PY) ou anti-IRβ (A). Extratos do músculo foram também IP com anticorpos, anti-IRS-1 e anti-IRS-2 e IB com anti-PY, anti-PI 3-q ou anti-IRS-1, anti-IRS-2, respectivamente (B, C, D e E). Por fim, extratos do tecido muscular foram IB com anticorpos, anti-fosfo-Akt e anti-Akt (E). Os dados foram normalizados de acordo com a média encontrada nos animais controles antes do estímulo com insulina. O grupo controle foi usado como referência comparativa para determinação dos resultados nos demais grupos e foram expressos como unidades arbitrárias. O sinal negativo (-) representa sem estímulo com insulina e o sinal positivo (+) com estímulo da insulina. Barras representam media e erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle e D-DC e # p<0.05 versus D-DHL.</p>

4.7- Sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal dos animais controles (C), sedentários alimentados com uma dieta hiperlipídica (S-DHL), destreinados alimentados com uma dieta hiperlipídica (D-DHL) e destreinados controle (D-DC) após 60 dias de dieta hiperlipídica.

Os resultados referentes ao efeito da dieta hiperlipídica nas etapas iniciais da via de sinalização da insulina do tecido adiposo epididimal foram apresentados na figura 6. Houve similar redução (40-50%), nos níveis de fosforilação em tirosina do IR induzido por insulina na gordura epididimal de ambos os grupos de animais S-DHL e D-DHL em relação ao grupo de animais controles (A). Por outro lado, o grupo S-DHL teve redução significativa nos níveis de fosforilação induzido por insulina do IRS-1, IRS-2 e IRS-3 (B, D e F) e na associação destes IRSs com a PI 3-q e também da fosforilação em serina da Akt (C, E, G e H) comparado aos ratos D-DHL.





**Figura 6-** Fatias do tecido adiposo extraídos dos ratos injetados com insulina ou salina foram preparadas como descritas em materiais e métodos e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos, anti-IR $\beta$  e imunoblotado (IB) com anti-fosfo-tirosina (PY) ou anti-IR $\beta$  (A). Tecidos extraídos foram também IP com anticorpos, anti-IRS-1, anti-IRS-2 e anti-IRS-3 e IB com anti-PY, anti-PI 3-q ou anti-IRS-1, anti-IRS-2 e anti-IRS-3, respectivamente (B, C, D, E, G e H). Por fim, extratos do tecido adiposo foram IB com anticorpos, anti-fosfo-Akt e anti-Akt (F). Os dados foram normalizados de acordo com a média encontrada nos animais controles antes do estímulo com insulina. O grupo controle foi usado como referência comparativa para determinação dos resultados nos demais grupos e foram expressos como unidades arbitrárias. O sinal negativo (-) representa sem estímulo com insulina e o sinal positivo (+) com estímulo da insulina. Barras representam media e erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle e D-DC e # p<0.05 versus D-DHL.

4.8- Sinalização da via CAP/Cbl no tecido adiposo epididimal dos animais controles (C), sedentários alimentados com uma dieta hiperlipídica (S-DHL) e destreinados alimentados com uma dieta hiperlipídica (D-DHL) após 60 dias de dieta hiperlipídica.

Verifica-se na figura 7, que houve aumento significativo na expressão da proteína Cbl (32% e 62%) e na expressão da proteína CAP (45% e 75%) no tecido adiposo dos animais dos grupos S-DHL e D-DHL, respectivamente, quando comparados aos animais controles (A e B). Por outro lado, os animais D-DHL tiveram um aumento significativamente maior da expressão destas proteínas do que os animais S-DHL. Houve também um aumento na fosforilação em tirosina estimulada por insulina da Cbl (41% e 51%), e da associação CAP/Cbl (25% e 83%) no tecido adiposo para os grupos de animais S-DHL e D-DHL, respectivamente, quando comparados aos ratos controles (C e D). Além disso, significativo aumento da fosforilação em tirosina estimulada por insulina da Cbl e da associação da CAP/Cbl ocorreu nos animais D-DHL se comparado aos animais S-DHL. Observa-se também, aumento na fosforilação em tirosina estimulada por insulina da proteína C3G (32% e 93%) no tecido adiposo dos ratos dos grupos S-DHL e D-DHL, respectivamente, quando comparados aos ratos do grupo controle (E). Houve também significativo aumento da fosforilação em tirosina estimulada por insulina da C3G nos animais D-DHL em relação aos animais S-DHL. Por fim. Houve maior expressão de GLUT4 (13% e 32%) nos animais S-DHL e D-DHL quando comparados aos animais controles. No entanto, os animais D-DHL apresentaram maior quantidade desta proteína em relação aos animais S-DHL (F).



Figura 7-Via CAP/Cbl no tecido adiposo. Extratos do tecido adiposo foram imunoblotados (IB) com anticorpos anti-c-Cbl e anti-CAP, respectivamente (A e B), imunoprecipitados (IP) com anti-Cbl e IB com anti-fosfo-tirosina (PY) (C). Extratos do tecido adiposo foram também IP com anti-CAP e IB com anti-Cbl (D). Por fim, estratos do tecido adiposo foram IB com anticorpo anti-fosfo-C3G (E) e IB com anti-GLUT4 (F). Os dados foram normalizados de acordo com a média encontrada nos animais controles antes do estímulo com insulina. O grupo controle foi usado como referência comparativa para determinação dos resultados nos demais grupos e foram expressos como unidades arbitrárias. O sinal negativo (-) representa sem estímulo com insulina e o sinal positivo (+) com estímulo da insulina. Barras representam media e erro padrão da média de n = 8 ratos.
\* p<0.05 versus controle e # p<0.05 versus D-DHL.</li>

# 4.9- Efeitos do destreinamento e da dieta hiperlipídica na fosforilação do IRS-1 em serina (Ser<sup>307</sup>) no fígado, músculo e tecido adiposo branco após 60 dias de dieta hiperlipídica.

A fosforilação do IRS-1 em serina 307 tem sido utilizada como indicador de resistência à insulina (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997; Aguirre et al 2002, Hirosumi et al 2002, Lee et al. 2003), mas os efeitos do destreinamento na fosforilação em serina do IRS-1 não têm sido investigados. Para testar tal hipótese, nós avaliamos a fosforilação em Ser 307 do músculo de ratos controles, S-DHL, D-DHL e D-DC. Como mostra a figura 8, houve um significativo aumento na fosforilação em serina do IRS-1 no figado, músculo e também no tecido adiposo dos animais S-DHL e D-DHL quando comparados aos grupos de animais controles (C e D-DC). Entretanto, nos animais D-DHL houve um aumento significativo na fosforilação em serina do IRS-1 no músculo comparado aos ratos S-DHL.

## 4.10- Efeitos do destreinamento e da dieta hiperlipídica na atividade da JNK no fígado, músculo e tecido adiposo branco após 60 dias de dieta hiperlipídica.

A ativação da JNK foi determinada monitorando a fosforilação da JNK (Thr 183 e Tyr 185) e c-Jun (ser 63), que é o substrato da JNK. Houve um aumento significativo na fosforilação da JNK no figado, músculo e tecido adiposo dos animais dos grupos S-DHL e D-DHL quando comparados aos animais dos grupos controle e D-DC (Fig. 8). Interessantemente, verifica-se que a fosforilação da JNK foi maior no músculo esquelético dos animais D-DHL em relação aos animais S-DHL. Consistente com a ativação da JNK, a fosforilação da c-Jun foi maior nos tecidos hepático, muscular e adiposo dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (S-DHL e D-DHL), quando comparados aos animais do grupo controle e D-DC (Fig. 8).

#### 4.11- Efeitos do destreinamento e da dieta hiperlipídica na fosforilação e degradação do IkBα no fígado, músculo e tecido adiposo branco após 60 dias de dieta hiperlipídica.

Por fim, nós avaliamos a via do IKK/NFkB, um importante complexo regulador da inflamação, e resistência à insulina induzida por obesidade e inflamação. A significativa função do complexo IKK é a ativação do NFkB através da fosforilação e degradação do IkBα (Hevener et al., 2003; Greten et al., 2004; Viatour et al., 2005). Então, para avaliar a ativação do NFkB, nós observamos a degradação o IkBα no figado, músculo e tecido adiposo dos animais controles, S-DHL, D-DHL e D-DC. Houve significativa diminuição na expressão do IkBα no figado, músculo e tecido adipose branco dos animais S-DHL e D-DHL quando comparados aos animais controles e D-DC (Fig. 8). Entretanto, nos ratos D-DHL houve maior diminuição na expressão de IkBα no músculo em relação aos ratos S-DHL.



Figura 8- Extratos dos tecidos hepático, muscular e adiposo foram imunoblotados com anticorpos anti-IRS-1 Ser307, anti-IkB, anti-fosfo-JNK e anti-fosfo-c-Jun. Os resultados representam a media e o erro padrão da média de n = 8 ratos. \* p<0.05 versus controle e D-DC e # p<0.05 versus D-DHL.</p>

### 5- DISCUSSÃO

Estudos em modelos animais e humanos mostram que a cessação do exercício físico leva a um aumento de peso corpóreo e a um rápido acréscimo do tecido adiposo (Walberg et al., 1983; Applegate & Stern, 1987; Eckel & Yost, 1987; Almeras et al., 1997). Entretanto, em algumas pesquisas, o destreinamento tem sido associado com um aumento na ingestão de calorias diárias, especialmente em ratos geneticamente predispostos a obesidade (Schemmel et al., 1970; Applegate & Stern, 1987). Com isso, tem sido difícil separar os efeitos referentes a mudanças alimentares, dos resultantes da cessação do treinamento físico. Em nosso estudo, não tivemos alterações na ingestão de alimento entre os grupos experimentais, pode-se assim, descartar qualquer interferência de uma possível hiperfagia com o destreinamento. Em estudos prévios a esse, utilizando o mesmo protocolo de exercício de natação, também não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar dos animais (Pauli et al., 2006; Crespilho et al., 2006). Portanto, o aumento significativo no ganho de peso e no acréscimo de tecido adiposo obtido pelos animais D-DHL quando comparados aos ratos S-DHL pode ser atribuído pela interrupção do programa de exercício de natação por si, sugerindo-se que o período de destreinamento promove um aumento na capacidade lipogênica independente de mudanças na ingestão de calorias ingeridas. Em acordo com nossos resultados, Lampert e colaboradores demonstraram que a razão do ganho de peso em uma e duas semanas em ratos destreinados foi significativamente maior do que animais sedentários ou treinados, e não houve diferenças na ingestão alimentar entre os grupos (Lambert et al., 1994). Em similaridade aos dados encontrados em nosso estudo, Giada e colaboradores, encontraram após 2 meses de destreinamento, um aumento de 2% e 4% na massa de tecido adiposo em ciclista jovens e idosos, respectivamente (Giada et al., 1995).

Interessantemente, observa-se em nosso estudo, que os ratos destreinados alimentados com a dieta padrão tiveram aumento de peso, de gordura epididimal e perirenal corporal semelhante aos ratos controles. Parece evidente, então, que a sobrecarga energética (dieta hiperlipídica) associada à condição de destreinamento físico foi responsável pelas alterações mais acentuadas no ganho de peso e de gordura epididimal encontrada nos animais do grupo D-DHL com relação aos demais grupos estudados. Assim, parece que os cuidados com a alimentação quando ocorre o cessamento do exercício físico é essencial para a manutenção da massa corpórea. Vale também ressaltar, que animais

submetidos à dieta hiperlipídica que continuaram no programa de exercícios de natação não tiveram alterações significativas no ganho de peso e na captação de glicose (dados não mostrados). Isso mostra que se manter fisicamente ativo foi essencial aos animais submetidos a dieta hiperlipídica. Portanto, além dos cuidados com a alimentação, não interromper definitivamente a atividade física podem ser estratégias importantes para manutenção do peso corporal.

Além disso, sabe-se que o aumento de peso é inversamente proporcional a sensibilidade à insulina. Por outro lado, diversos estudos demonstraram que o exercício físico tanto agudo como crônico pode ter efeitos benéficos na ação da insulina em situações de resistência a esse hormônio, mesmo quando não há redução no peso corporal (Luciano et al., 2002; Peres et al., 2005; Ropelle et al., 2006). Entretanto, os efeitos induzidos pelo exercício físico não permanecem por longos períodos e são revertidos num curto espaço de tempo após a cessação do treinamento (Houmard *et al.*, 1993; Arciero *et al.*, 1998).

Estudos prévios mostraram que o exercício físico aumenta a responsividade à insulina em adipócitos, músculo esquelético, e fígado, e este aumento na captação de glicose envolve no mínimo em parte a participação da via IRSs/PI3-quinase/Akt (Luciano et al., 2002; Peres et al., 2005; Ropelle et al., 2006). Por outro lado, a ingestão de dieta rica em lipídes é associada com uma redução na captação de glicose em diferentes tecidos, caracterizado pela redução na sensibilidade à insulina no fígado, músculo, hipotálamo, e mais tardiamente no tecido adiposo (Hotamisligil *et al.*, 1995; Katsuki *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostram que os animais submetidos a uma alimentação rica em lipídes tiveram uma redução na taxa de desaparecimento da glicose avaliada pelo teste de tolerância à insulina intraperitonial (TTIip) quando comparados aos animais controles. No entanto, observa-se que os ratos D-DHL foram menos responsivos à insulina do que os ratos S-DHL no teste. Tal fato foi confirmado pelo maior valor do índice HOMA desses animais. Interessantemente, a diferença significativa encontrada no TTIip aconteceu apenas após as 8 semanas da ingestão da dieta hiperlipídica. Nos testes prévios, realizados após 36 horas da última sessão de exercício (1º teste), 7º, 15º e 30º dias de experimento não foram encontradas diferenças significativas na taxa de desaparecimento da glicose nos animais sedentários e destreinados alimentados com a dieta hiperlipídica quando comparados aos animais controles (C e D-DC). No entanto, observa-se nesse período uma tendência a maior declínio na remoção da glicose no TTI nos animais destreinados em relação aos demais grupos estudados. Diante desses resultados, investigamos a ação da insulina através da análise de proteínas iniciais a via de sinalização deste hormônio (via IRSs/PI 3-q/Akt) em dois momentos distintos: no início, logo após os primeiros 15 dias e ao final do experimento após os 60 dias da ingestão da dieta hiperlipídica.

Nossos resultados mostram que a fosforilação em tirosina das proteínas iniciais da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1 e IRS-2) não sofreram alterações significativas nos animais alimentados por 15 dias com a dieta hiperlipídica, tendo estes semelhantes respostas à insulina se comparada aos controles que permaneceram em dieta padrão. Além disso, a associação dessas proteínas com a PI 3-q também não foram diferentes entre os grupos experimentais (dados não mostrados) e o mesmo aconteceu para a ativação da Akt. Assim, parece que a ingestão da dieta hiperlipídica por 15 dias não é suficiente para induzir alterações nas etapas inicias da via de sinalização da insulina. No entanto, como dito anteriormente, verifica-se que nesse período houve uma queda (sem diferença significativa) na taxa de consumo da glicose avaliada pelo TTIip entre os animais que receberam a dieta rica em lipídes, sendo esta ainda maior no grupo de ratos D-DHL. Tal fato sugere que outros mecanismos devem atuar para que ocorra esse declínio na captação de glicose no início do período de destreinamento. Porém, antes de qualquer investigação mais minuciosa nesse período, investigou-se a mesma via de sinalização da insulina nos diferentes tecidos (figado, músculo e adiposo) após os 60 dias de consumo da dieta hiperlipídica.

Nossos resultados mostram que no figado dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica houve variações nos graus de fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, da associação destas proteínas com a PI 3-q e da atividade da Akt. Observa-se, que a dieta hiperlipídica modula negativamente as proteínas das etapas inicias da via de sinalização da insulina e isso contribui para a resistência à insulina nesse tecido. A menor ação da insulina no figado tem sido relacionada com maior produção de glicose e gliconeogênese aumentada. Além disso, em longo prazo a insulino-resistência, pode conduzir ao acúmulo de gordura nos

hepatócitos pelo aumento da lipólise, com aumento de ácidos graxos circulantes e hiperinsulinemia. Em trabalho realizado recentemente em nosso laboratório, observou-se, que o tratamento de camundongos da cepa Swiss com dieta rica em lípides leva a resistência à insulina, obesidade e esteatose (De Souza *et al.*, 2005b). Portanto, tomar medidas preventivas se torna importante para evitar o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica e DM tipo 2 quando se faz o uso de dieta hiperlipídica.

No músculo esquelético, também ocorreu uma diminuição na fosforilação do IR e dos IRSs nos animais submetidos a dieta hiperlipídica. Além disso, houve uma menor associação dos IRSs com a PI 3-q e ativação da Akt nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica quando comparados aos animais que receberam somente a dieta padrão. Surpreendentemente, os animais D-DHL apresentaram uma redução mais significativa na fosforilação do IRS-1 e da associação desta proteína com a PI 3-q, e ainda menor ativação da Akt em relação aos animais S-DHL. Desta forma, identificamos pelo menos três pontos importantes em que à dieta hiperlipídica resultou em modificações negativas na via de sinalização da insulina no músculo esquelético dos animais destreinados. O comprometimento da ação da insulina no músculo através da via IRS-1/PI3-q/Akt resulta em menor captação de glicose mediada pela translocação do transportados de glicose (GLUT-4) para a superfície celular, que é um facilitador da difusão da glicose. Como o músculo esquelético representa 40% da massa tecidual total do nosso corpo, este tem papel primordial no metabolismo da glicose. Assim, esta modulação negativa da dieta hiperlipídica sob as proteínas da cascata de sinalização da insulina em animais destreinados contribui para a resistência à insulina e pode explicar em parte a menor taxa de desaparecimento da glicose encontrada no TTIip nesses animais.

O IRS-1 é importante substrato do receptor de insulina, transmitindo a ativação do IR até a ativação da PI 3-q. Esta via é fundamental para os efeitos metabólicos da insulina, notadamente aumento da captação de glicose, síntese de glicogênio e protéica e inibição da gliconeogênese. (Saltiel & Kahn, 2001). Estudos em camundongos geneticamente modificados mostram que animais que não expressam IRS-1, são resistentes à insulina. Em estudos com restrição tecido-específica da expressão de IRS-1 e IRS-2, observa-se que o IRS-1 é o principal mediador da ação metabólica da insulina em tecido

muscular. Além disso, vários outros indícios sugerem um papel importante da redução dos níveis teciduais de IRS-1 no desenvolvimento de resistência à insulina. Em modelos animais de resistência à insulina, como no camundongo ob/ob (Saad *et al.*, 1992), ou na obesidade induzida por dieta (Kim *et al.*, 1996), observamos níveis teciduais diminuídos de IRS-1 em músculo. E uma menor expressão tecidual de IRS-1 em músculo mostrou-se fator de risco isolado para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (Carvalho *et al.*, 2001; Jansson *et al.*, 2003). Portanto, a diminuição no sinal da insulina através da menor fosforilação do IRS-1 nos animais destreinados submetidos à dieta hiperlipídica aparece como importante sítio de desenvolvimento de resistência à insulina.

Quanto ao tecido adiposo, tivemos resultados semelhantes aos encontrados nos outros tecidos descritos acima. Evidencia-se, uma menor fosforilação das proteínas iniciais da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1, IRS-2 e IRS-3), e da associação delas com a PI 3-q e consequentemente da ativação da Akt nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica. No entanto, nota-se que as mudanças foram mais discretas nos animais destreinados se comparados aos sedentários. Com o destreinamento os animais apresentaram uma diminuição na fosforilação do IR e dos IRSs, da associação destes substratos com a PI 3-q e ativação da Akt menos acentuada do que nos ratos sedentários. É possível que esta maior capacidade de resposta à insulina preservada entre os animais destreinados possa ter contribuído, no mínimo em parte, com o aumento expressivo da gordura epididimal e perirenal ao final do experimento.

Coletivamente esses resultados mostram que a dieta hiperlipídica resulta em alterações importantes a sinalização da insulina nos três tecidos estudados: músculo, fígado e adiposo. Além disso, os efeitos negativos da dieta hiperlipídica sob a via IRSs/PI3-q/Akt foram mais acentuadas no músculo de animais destreinados após 8 semanas. No entanto, o decréscimo na taxa do consumo de glicose (não significativa) durante o TTIip nos animais D-DHL após 15 dias de experimento não envolve a participação das proteínas de sinalização da insulina, já que nesse período não foram encontradas alterações significativas na via IRSs/PI3-q/Akt nos diferentes tecidos estudados. Para investigar esta questão, escolhemos o tecido muscular que apresentou alterações mais significativas em resposta à dieta hiperlipídica e ao destreinamento aos 60 dias. Como o músculo esquelético

esta diretamente envolvido tanto com o treinamento (contração muscular) quanto com o destreinamento (desuso muscular) é possível que mudanças nesse tecido, ao menos em parte, sejam responsáveis pela documentada diminuição da taxa de consumo de glicose observada nesses animais durante o Kitt.

Nos últimos anos tem sido encontrado alterações mitocôndriais em modelos animais de obesidade e diabetes tipo 2 (Esterbauer *et al.*, 2001; Schrauwen *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004; Schrauwen & Hesselink 2003; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2007; Samec et al., 1999). No entanto, são poucos os estudos que procuram investigar a participação desta organela no destreinamento. Identificou-se, em diversos estudos alterações no dispêndio energético em mitocôndrias que expressam proteínas desacopladoras (UCPs). Mais especificamente, a isoforma 3 destas proteínas (UCP-3), amplamente expressada em mitocôndrias de músculos esqueléticos parece ter papel importante no metabolismo lipídico e gasto energético. Devido ao fato de a UCP-3 funcionar como dissipadora da energia (sob a forma de calor) que seria utilizada para ressíntese de ATP, indiretamente ela provoca maior consumo de substratos energéticos. Foi demonstrado que a expressão gênica de UCP-3 no músculo está diminuída na obesidade (Schrauwen *et al.*, 1999). Por outro lado, a superexpressão desta proteína no músculo protege contra a obesidade e diabetes induzidas por dieta (Schrauwen & Hesselink, 2004).

Além disso, o conteúdo de triglicerídeos intramuscular (TGIM) tem sido implicado no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (He *et al.*, 2001; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2007). Nesse contexto, é interessante notar que atletas altamente treinados também têm altos níveis de TGIM, mas são extremamente responsivos à insulina (Goodpaster *et al.*, 2001). Em geral, esse paradoxo é explicado pela alta capacidade oxidativa dos atletas. Assim, nossos dados estão em conforme a esta idéia e sugere que altos níveis de TGIM estão somente associados com o diabetes do tipo 2 se combinado com baixa capacidade oxidativa, e isso provavelmente acontece no período de destreinamento.

A adequação no músculo esquelético em resposta ao desuso (destreinamento), com reduzida atividade das enzimas oxidativas, associado aos níveis elevados de TGIM adquiridos no período de treinamento, provavelmente seja um dos mecanismos imediatos que desfavorece a captação de glicose quando ocorre o cessamento do exercício físico. Fato interessante, é que os níveis de leptina podem regular o metabolismo lipídico e o gasto energético. Segundo Petibois et al. (2006), o aumento da concentração de leptina inibe a atividade da lípase hormônio sensível (enzima lipolítica), permitindo o armazenamento de triglicerídeos e um menor metabolismo de ácidos graxos. Além disso, acredita-se que o conteúdo de triglicerídeos permanece aumentado depois de estabelecido a resistência à insulina, sugerindo que o reganho de massa adiposa através do armazenamento de triglicerídeos e colesterol é no mínimo em parte independente da resistência à insulina. Assim, parece que o transporte de triglicerídeos permanece estável durante o destreinamento, enquanto o seu metabolismo diminui. Em nosso estudo, encontramos concentrações mais elevadas de leptina no animais D-DHL em relação aos animais S-DHL. Como a concentração desse hormônio é relativa à massa de gordura, nossos resultados são coerentes com a literatura uma vez que os animais D-DHL tiveram um acréscimo mais expressivo de tecido adiposo em relação aos demais grupos de animais estudados.

O mecanismo pela qual a baixa capacidade oxidativa pode conduzir a resistência à insulina e ao diabetes do tipo 2 pode envolver o acúmulo de triglicerídeos e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e fígado (Shulman, 2000). Estudos inovadores mostraram através da técnica de ressonância magnética alta correlação entre o conteúdo de triglicérides intramiocelular e resistência à insulina em pacientes com obesidade e diabetes do tipo 2 (Petersen *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2004). Segundo Savage e colaboradores, o aumento do TGIM e de seus metabólitos diminui o sinal da insulina, através da ativação de serinas quinases, como a JNK e o IKK, que agem negativamente sobre a via da insulina, fosforilando o IR e o IRS-1 em resíduos de serina (Savage et al., 2005). Assim, para a prevenção do acúmulo excessivo de triglicerídeos no músculo esquelético e da obesidade, o papel da UCP-3 no músculo está sendo estudado (Schrauwen et al., 2003).

A redução na função mitocondrial e aumento do conteúdo de TGIM têm sido encontrados em pessoas insulino resistentes (Goodpaster *et al.*, 2001; He *et al.*, 2001). Em nosso estudo, mostramos que animais destreinados apresentam menor expressão de UCP3, que é acompanhada de uma menor atividade das UCPs e aumento da concentração de triglicerídeos no músculo esquelético quando comparado aos animais sedentários. O interessante, é que estudos prévios a este mostraram que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade diminui a expressão de UCP-3 (Boss et al., 1998). Tal fato pôde ser confirmado por um grupo de pesquisadores que mostraram a expressão de UCP-3 diminuída no músculo tanto de humanos quanto de animais treinados após a última sessão de exercício físico (Boss et al., 1998). É possível que esta adaptação seja um mecanismo defensivo do organismo já que a diminuição da atividade desta proteína direciona o uso de substratos ao máximo para geração de energia (síntese de ATP), o que é fundamental para manutenção do exercício por longos períodos e para a recuperação das reservas de glicogênio após o término do esforço. No entanto, parece que tal comportamento permanece com o destreinamento e como nesta situação não há mais a necessidade de eficiência na produção de ATP, sugere-se que isso contribua com o ganho de peso e acréscimo rápido de gordura corporal em nosso modelo experimental. Isto ocorre, ao menos parcialmente, como resultado do redirecionamento da captação de glicose para o tecido adiposo em consequência da resistência no músculo e até mesmo do fígado, com subseqüente aumento da massa adiposa.

Para confirmação da participação das UCPs no desenvolvimento de obesidade, além da quantificação dos níveis de UCP-3 no músculo pela técnica de imunoblot, realizamos mais 2 experimentos para comprovar a possível menor atividade destas proteínas com o destreinamento. Como descrito nos resultados, a adição de ADP a mitocôndria, promove a diminuição do potencial de ação ( $\Delta\mu$ H<sup>+</sup>) devido à captação de ADP pela mitocôndria para fosforilação oxidativa. Verificamos que o restabelecimento do  $\Delta\mu$ H<sup>+</sup> após a adição de ADP ocorre mais rapidamente em mitocôndrias de ratos D-DHL quando comparadas às mitocôndrias de ratos S-DHL. Esses resultados indicam que as mitocôndrias de ratos D-DHL possuem uma capacidade de fosforilação oxidativa mais eficiente, o que pode ser resultado de uma menor atividade de UCPs nessas mitocôndrias. Além disso, para comprovar a existência de uma menor atividade de UCPs nos animais destreinados realizamos outro experimento que consistiu na infusão de ácido linoleico (LA) ao meio de tampão em que estava as mitocôndrias isoladas. No espaço intermembrana o LA protonado funciona como transportador de H<sup>+</sup> do espaço intermembranas para a matriz e sua extrusão da matriz, de volta ao espaço intermembranas ocorre via UCP, gerando um ciclo fútil de AGL, o que mantém o  $\Delta \mu H^+$  diminuído. Nota-se, que nos animais destreinados a presença ou não de GDP (inibidor de UCP), não resulta na diminuição do potencial de ação. Por outro lado, nos animais S-DHL a ausência de GDP resulta numa queda do potencial, em resposta a maior atividade de UCPs.

Assim, parece que em nosso estudo, as variações no conteúdo de TGIM e das UCPs mitocôndriais no músculo dos animais destreinados são os eventos primários responsáveis pelo aumento de peso corporal e pela diminuição na sensibilidade à insulina. Desse modo, pode-se sugerir que as estratégias preventivas devam ser tomadas logo no início do destreinamento para se evitar o acúmulo excessivo de gordura e um declínio na sensibilidade à insulina no músculo, que em longo prazo pode resultar em obesidade e DM2.

Por outro lado, como já discutido anteriormente as alterações na sinalização da insulina que acontecem principalmente no músculo esquelético de animais destreinados após 60 dias do experimento devem ter relação com o aumento de tecido adiposo. Evidências experimentais são indicativas de que os adipócitos produzem e secretam substâncias (citocinas) altamente ativas e de importância fisiológica que interferem na resistência à insulina, tais como: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Xu *et al.*, 2003; Calle & Kaaks, 2004; Tilg & Moschen, 2006). Assim, determinar os mecanismos moleculares que favorecem o acréscimo de gordura pode auxiliar na prevenção quando por algum motivo acontece o cessamento do exercício físico por um tempo indeterminado.

Pesquisa recente, demonstrou que o treinamento físico aeróbio realizado em esteira num período de 7 semanas, aumenta a responsividade à insulina em adipócitos isolados através da via IRS/PI 3-quinase/Akt (Peres *et al.*, 2005). No entanto, os autores verificaram que tal modulação ocorreu logo após 24 horas da última sessão de exercício físico. Em nosso estudo, verifica-se que a dieta hiperlipídica consumida durante 60 dias induz resistência à insulina no tecido adiposo. Porém, como apresentado anteriormente, os animais destreinados foram mais responsivos à insulina através da via IRS-PI 3-q/Akt do que os ratos sedentários e isso pode explicar em parte o maior ganho de gordura.

Resultado mais impressionante aconteceu quando se avaliou a via CAP/Cbl no tecido adiposo. Observa-se um aumento na fosforilação induzida por insulina da proteína Cbl, e em paralelo ocorreu o aumento na associação da CAP/Cbl, como também, um aumento na expressão de CAP e Cbl no tecido adiposo dos ratos S-DHL e D-DHL. Houve também, um aumento na fosforilação em tirosina induzida por insulina da proteína C3G desses animais. No entanto, ocorreu significativo aumento na expressão e fosforilação dessas proteínas acima descritas nos animais do grupo D-DHL quando comparados aos ratos sedentários. Portanto, esta maior sensibilidade nas etapas da via de sinalização da insulina com a habilidade da insulina em estimular a via CAP/Cbl/C3G no tecido adiposo dos ratos D-DHL possivelmente contribuiu para o maior acumulo de gordura após a cessação do treinamento físico. Estudo prévio em nosso laboratório mostrou que ratos sedentários alimentados com dieta rica em lipídes são resistentes à insulina, com decréscimo na ação deste hormônio através da via IRS/PI3-gunase/Akt em tecido adiposo. No entanto, a habilidade da insulina em estimular a captação de glicose pela via CAP/Cbl/C3G é mantida, o que explica o aumento da gordura epididimal desses animais por longos períodos (Prada et al., 2005; Prada et al., 2006).

Em síntese, nossos achados, são compatíveis com os descritos na literatura, de que a dieta rica em lipídes é capaz de exercer efeito regulador negativo nas vias de sinalização metabólica da insulina, causando resistência periférica ao hormônio. Além disso, a grande novidade do nosso estudo, é que os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica foram mais pronunciados em animais destreinados quando comparados a ratos sedentários, e especialmente o tecido muscular esquelético parece sofrer mudanças mais precoces em seu metabolismo, que em virtude da menor expressão e atividade de UCP-3 e elevado níveis de TGIM acaba influenciando sobremaneira na resistência à insulina e aumento da massa adiposa no início do destreinamento.

Em compensação, como já demonstrado, ocorre uma piora da resistência à insulina no transcorrer do período de destreinamento, e após 60 dias de experimento, encontra-se uma diferença significativa no TTI entre animais destreinados e sedentários. Se no início a insulino-resistência esta associada ao acúmulo de TGIM, acreditamos que tardiamente possa estar associada à produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias

como o TNF $\alpha$  e a IL-6 pelo tecido adiposo. A expressão e a secreção de TNF $\alpha$  estão aumentadas em animais e humanos obesos, correlacionando positivamente com o aumento do volume de adipócitos (Hotamisligil *et al.*, 1995; Katsuki *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1998). Um estudo comparando indivíduos com peso ideal (IMC 19-24 kg/m<sup>2</sup>) e obesos (IMC 32-54 kg/m<sup>2</sup>) demonstrou correlação positiva entre RNAm de TNF $\alpha$ e IMC, sugerindo que altos níveis de TNF $\alpha$  se correlacionam com acúmulo de tecido adiposo, principalmente em obesos (Montague *et al.*, 1998). O grupo de evidências definitivo para uma possível relação de causa e efeito entre TNF $\alpha$  e resistência à insulina, veio do estudo de modelos animais com mutação nos receptores de TNF $\alpha$  ou que não expressavam esta interleucina. Estes animais mostraram-se protegidos do desenvolvimento de resistência à insulina associado à obesidade, fosse ela dieteticamente ou geneticamente determinada (Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997).

Com a finalidade de verificar se o maior ganho de peso adquirido pelos animais destreinados estava envolvido com a menor atividade das proteínas de sinalização celular da insulina e, consequentemente na causa da resistência à insulina encontrada no fígado e principalmente no músculo gastrocnêmio, decidimos avaliar expressão e a atividade de duas proteínas da via inflamatória, a JNK e o IkB nos tecidos hepático, muscular e adiposo após as 8 semanas de experimento. Como já discutido anteriormente, um dos principais mecanismos de resistência à insulina descritos é a fosforilação do IRS-1 em serina, notadamente a da posição 307. Isto impede que o IRS-1 seja posteriormente fosforilado em tirosina e, portanto inibe a atividade tirosina-quinase do receptor de insulina. Estudos mostraram que a ativação da JNK foi implicada nesta ação. A inibição farmacológica desta proteína evita a fosforilação em serina 307 estimulada pelo TNF $\alpha$  e restaura a fosforilação do IRS-1 em tirosina estimulada por insulina, elevando a sensibilidade à insulina (Wellen & Hotamisligil, 2005).

Além da via da JNK, uma outra via inflamatória ativada por TNFα tem recebido muita atenção nos últimos anos devido ao seu potencial em estabelecer conexões entre resposta inflamatória e resistência à insulina: a via IKK/IkB/NFkB (Gao *et al.*, 2002; Dempsey *et al.*, 2003a). O bloqueio desta via em animais obesos induzidos por dieta pode evitar o surgimento da resistência à insulina induzido pelo TNFα (Yuan M 1173-1677,

2001). Além do efeito direto do IKK $\beta$  em fosforilar o IRS-1 em resíduos de serina, ele pode ativar indiretamente o NFkB, um fator de transcrição que, dentre outros alvos, pode estimular a produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF $\alpha$ . O NFkB mantém-se seqüestrado no citoplasma associado ao IkB. No entanto, a fosforilação do IKK $\beta$  é capaz de fosforilar e degradar o IkB fazendo com que o NFkB dirija-se até o núcleo onde promove a transcrição gênica de proteínas inflamatórias.

Nossos resultados mostram que a atividade da JNK, a degradação do IkB e a fosforilação em serina do IRS-1 foram maiores no figado dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica quando comparados aos animais controles. Este dado é coerente com a diminuição na sinalização da insulina no tecido hepático encontrada em ambos os grupos de animais que receberam a dieta hiperlipídica.

No músculo esquelético, observam-se resultados semelhantes ao encontrados no fígado, ou seja, animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maior atividade das proteínas inflamatórias se comparado aos controles. Surpreendentemente, os animais destreinados tiveram um aumento significativo na fosforilação em serina do IRS-1, da ativação da JNK e da degradação do IkB quando comparado aos animais sedentários. Portanto, a resposta inflamatória em decorrência do ganho mais acentuado de gordura, participa negativamente nas etapas iniciais da sinalização da insulina no músculo de ratos destreinados.

Variações na expressão dessas proteínas inflamatórias também aconteceram no tecido adiposo. Nota-se, que os animais submetidos à dieta hiperlipídica tiveram um aumento na atividade da JNK, maior degradação do IkB e maior fosforilação do IRS-1 em serina. No entanto, pode-se considerar que o processo inflamatório no tecido adiposo foi menor se comparado ao encontrado no músculo e figado. Isto sugere que nesse tecido a ação negativa destas proteínas inflamatórias acontece mais tardiamente talvez em reposta a capacidade preservada desse tecido em armazenar energia. Assim, parece que esse tecido permanece em hipertrofia e de forma impressionante produz e secreta citocinas pró-inflamatórias que resultam em prejuízos a ação da insulina aos demais tecidos periféricos (músculo e figado).

Diante dos resultados encontrados em nosso estudo, parece que o período de destreinamento esta associado com mudanças moleculares que favorecem o acúmulo de energia, resultando em ganho de peso e rápido acréscimo do tecido adiposo. No início, parece que as mudanças acontecem mais especificamente no músculo esquelético. Pode-se dizer que a menor atividade e expressão das proteínas desacopladoras, mais especificamente da UCP-3 em mitocôndriais de músculo esquelético de animais destreinados indiretamente favorece o acúmulo de gordura no início do destreinamento. Além disso, a maior responsividade à insulina em tecido adiposo através das vias IRSs/PI 3q/Akt e CAP/Cbl de animais destreinados, favorece o armazenamento de energia e aumento da massa adiposa. Por fim, ao que tudo indica, o aumento do tecido adiposo agrava a resistência à insulina e ao persistir em longo prazo pode evoluir para o diabetes do tipo 2. Esta idéia é compatível com a de outros pesquisadores que demonstraram em seus estudos que o aumento do tecido adiposo induzido por dieta ou modificação genética secreta citocinas pró-inflamatórias que são capazes de ativar vias inflamatórias que atuam negativamente nas vias de sinalização da insulina (Hotamisligil et al., 1993; Xu et al., 2003). Em nosso estudo, verificamos que a atividade tanto da JNK quanto do complexo IKK/IkB/NFkB resulta em fosforilação do IRS-1 em serina, interferindo negativamente ao sinal da insulina. Acreditamos que estes não sejam os únicos mecanismos de resistência à insulina relacionada à obesidade. Mas levando em consideração a importância destas proteínas em induzir resistência à insulina, acreditamos que tanto a JNK quanto o IkB sejam representantes importantes da estreita relação entre sistema inflamatório e metabólico, que de maneira importante resultam em alterações negativas na via de sinalização da insulina em tecidos periféricos dos animais destreinados submetidos à dieta hiperlipídica. Portanto, tomar decisões preventivas contra o aumento de gordura corporal torna-se essencial numa situação de destreinamento associado à ingestão de dieta hiperlipídica. Cuidados com a alimentação e a manutenção da prática regular de exercícios físicos são algumas medidas preventivas que podem ser tomadas com intuito de garantir melhor qualidade e maior expectativa de vida as pessoas.

#### 6- CONCLUSÃO

Consideramos que o destreinamento esta associado a diversas mudanças moleculares que favorecem ao ganho de peso e acréscimo de tecido adiposo. O músculo esquelético em particular, e o tecido adiposo, podem ser considerados peças chaves nessas mudanças. O primeiro apresenta alterações na atividade das UCPs e acúmulo de triglicerídeos, que parecem ser os eventos inicias para o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina. O tecido adiposo, mais responsivo à insulina em animais destreinados, principalmente através da via CAP/Cbl, aumenta progressivamente de tamanho e esta envolvido com a ativação de proteínas de resposta imune inata em geral, que são responsáveis por alterações na cascata de sinalização da insulina, induzindo resistência à insulina e que em longo prazo pode evoluir ao desenvolvimento do diabetes do tipo 2. Portanto, estes novos achados, mostram que medidas preventivas devem ser tomadas desde o início do destreinamento e os cuidados com a alimentação e com a manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo pode ser o segredo para se ter melhor qualidade e maior expectativa de vida.

### 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). J Biol Chem 275, 9047-9054.

Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E. & White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem 277, 1531-1537.

Ahima, R. S. & Flier, J. S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab 11, 327-332.

Almeras, N., Lemieux, S., Bouchard, C. & Tremblay, A. (1997). Fat gain in female swimmers. Physiol Behav 61, 811-817.

Applegate, E. A. & Stern, J. S. (1987). Exercise termination effects on food intake, plasma insulin, and adipose lipoprotein lipase activity in the Osborne-Mendel rat. Metabolism 36, 709-714.

Applegate, E. A., Upton, D. E. & Stern, J. S. (1984). Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. J Nutr 114, 447-459.

Arciero, P. J., Smith, D. L. & Calles-Escandon, J. (1998). Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. J Appl Physiol 84, 1365-1373.

Argiles, J. M., Busquets, S. & Lopez-Soriano, F. J. (2002). The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. Biochem Biophys Res Commun 293, 1145-1152.

Bachman, E. S., Dhillon, H., Zhang, C. Y., Cinti, S., Bianco, A. C., Kobilka, B. K. & Lowell, B. B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. Science 297, 843-845.

Backer, J. M., Myers, M. G., Jr., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J. & et al. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. Embo J 11, 3469-3479.

Bézaire V., Seifert E.L., Harper M-E. (2007). Uncoupling protein-3 : clues in an ongoing mitocondrial mystery. The FASEB journal 21, 312-324.

Bao, S., Kennedy, A., Wojciechowski, B., Wallace, P., Ganaway, E. & Garvey, W. T. (1998). Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. Diabetes 47, 1935-1940.

Barreiro, G. C., Prattali, R. R., Caliseo, C. T., Fugiwara, F. Y., Ueno, M., Prada, P. O., Velloso, L. A., Saad, M. J. & Carvalheira, J. B. (2004). Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. In Biochem Biophys Res Commun, vol. 320, pp. 992-997.

Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. Nature 407, 202-207.

Bedard, S., Marcotte, B. & Marette, A. (1997). Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. Biochem J 325 (Pt 2), 487-493.

Bezaire V., Sprict L.L., Campbell S., Sabet N., Gerrits M., Bonen A & Harper M.E. (2005). Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. FASEB J, 19, 977-979.

Blackburn, G. L. (2001). Pasteur's Quadrant and malnutrition. Nature 409, 397-401.

Booth, F. W., Chakravarthy, M. V. & Spangenburg, E. E. (2002). Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. J Physiol 543, 399-411.

Booth, M. A., Booth, M. J. & Taylor, A. W. (1974). Rat fat cell size and number with exercise training, detraining and weight loss. Fed Proc 33, 1959-1963.

Boss, O., Hagen, T. & Lowell, B. B. (2000). Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. Diabetes 49, 143-156.

Boss, O., Samec, S., Desplanches, D., Mayet, M. H., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J. P. (1998). Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. Faseb J 12, 335-339.

Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. & Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett 408, 39-42.

Boyle, P. C., Storlien, L. H., Harper, A. E. & Keesey, R. E. (1981). Oxygen consumption and locomotor activity during restricted feeding and realimentation. Am J Physiol 241, R392-397.

Calle, E. E. & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat Rev Cancer 4, 579-591.

Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296, 1655-1657.

Carvalho, E., Jansson, P. A., Nagaev, I., Wenthzel, A. M. & Smith, U. (2001). Insulin resistance with low cellular IRS-1 expression is also associated with low GLUT4 expression and impaired insulin-stimulated glucose transport. Faseb J 15, 1101-1103.

Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., Carvalheira, J. B., de Oliveira, M. G., Velloso, L. A., Curi, R. & Saad, M. J. (2005). S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. Diabetes 54, 959-967.

Chandra, R. K. (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14304-14307.

Chauveau, A., Kaufmann, M. (1887). Expériences pour la determination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles es respos et en travail. Comptes Rendus Hebbomadaires des Seances de l'Academie des Sciences 104, 1887.

Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. Nature 410, 944-948.

Cortright, R. N., Zheng, D., Jones, J. P., Fluckey, J. D., DiCarlo, S. E., Grujic, D., Lowell, B. B. & Dohm, G. L. (1999). Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation. Am J Physiol 276, E217-221.

Craig, B. W., Thompson, K. & Holloszy, J. O. (1983). Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. J Appl Physiol 54, 571-575.

Crespilho D.M., Pauli J.R., Leme J.A.C., Luciano E. (2006). Effects of physical training on metabolic and immunology aspects in rats administered with dexamethasone. Biosci J 22, 109-118.

De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. & Velloso, L. A. (2005a). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology 146, 4192-4199.

De Souza, C. T., Araujo, E. P., Prada, P. O., Saad, M. J., Boschero, A. C. & Velloso, L. A. (2005b). Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. Diabetologia 48, 1860-1871.

DeFronzo, R. A. (1988). Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. Diabetes 37, 667-687.

Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q. & Cheng, G. (2003a). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev 14, 193-209.

Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q. & Cheng, G. (2003b). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. In Cytokine Growth Factor Rev, vol. 14, pp. 193-209.

Diehl, A. M. & Hoek, J. B. (1999). Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". J Bioenerg Biomembr 31, 493-506.

Dohm, G. L., Barakat, H. A., Tapscott, E. B. & Beecher, G. R. (1977). Changes in body fat and lipogenic enzyme activities in rats after termination of exercise training. Proc Soc Exp Biol Med 155, 157-159.

Dulloo, A. G. & Samec, S. (2000). Uncoupling Proteins: Do They Have a Role in Body Weight Regulation? News Physiol Sci 15, 313-318.

Eckel, R. H. & Yost, T. J. (1987). Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. J Clin Invest 80, 992-997.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L. & Kennedy, B. P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science 283, 1544-1548.

Eldar-Filkelman H & Krebs E.G. (1997). Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. Proc Natl Acad Sci USA 94, 9660-9664.

Esterbauer, H., Schneitler, C., Oberkofler, H., Ebenbichler, C., Paulweber, B., Sandhofer, F., Ladurner, G., Hell, E., Strosberg, A. D., Patsch, J. R., Krempler, F. & Patsch, W. (2001). A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. Nat Genet 28, 178-183.

Fasshauer, M. & Paschke, R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. Diabetologia 46, 1594-1603.

Flier, J. S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 116, 337-350.

Fried, S. K., Hill, J. O., Nickel, M. & DiGirolamo, M. (1983). Prolonged effects of fastingrefeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity: influence of caloric restriction during refeeding. J Nutr 113, 1861-1869.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F. J. & Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab 280, E827-847.

Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M. J. & Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. J Biol Chem 277, 48115-48121.

Giada, F., Vigna, G. B., Vitale, E., Baldo-Enzi, G., Bertaglia, M., Crecca, R. & Fellin, R. (1995). Effect of age on the response of blood lipids, body composition, and aerobic power to physical conditioning and deconditioning. Metabolism 44, 161-165.

Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Woolf, E. A. & Tartaglia, L. A. (1997). Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. Diabetes 46, 900-906.

Goodpaster, B. H., He, J., Watkins, S. & Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. J Clin Endocrinol Metab 86, 5755-5761.

Goodyear, L. J. & Kahn, B. B. (1998). Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. Annu Rev Med 49, 235-261.

Gray, P. W., Aggarwal, B. B., Benton, C. V., Bringman, T. S., Henzel, W. J., Jarrett, J. A., Leung, D. W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L. P. & et al. (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. Nature 312, 721-724.

Greten F.R., Eckmann L., Greten T.F., Park J.M., Li Z.W., Egan LJ., Kagnoff MF & Karin M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitisassociated cancer. Cell 118, 285-296.

Gupta, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. In Exp Gerontol, 37, 293-299.

Hamann, R. (2002). Prevention of type 2 diabetes mellitus. The evidence base for diabetes care. T.J. Williams RL, Herman WH, eds. London, John Wiley & Sons.

Himms-Hagen J. & Harper M.E. (2001). Physiological role of UCP-3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. Exp. Biol. Med , 226, 78-84.

He, J., Watkins, S. & Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. Diabetes 50, 817-823.

Heath, G. W., Gavin, J. R., 3rd, Hinderliter, J. M., Hagberg, J. M., Bloomfield, S. A. & Holloszy, J. O. (1983). Effects of exercise and lack of exercise on glucose tolerance and insulin sensitivity. J Appl Physiol 55, 512-517.

Heller, R. A. & Kronke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. J Cell Biol 126, 5-9.

Herman, M. A. & Kahn, B. B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. J Clin Invest 116, 1767-1775.

Hevener AL., He W., Barak Y., Le J., Bandyopadhyay G., Olson P,., Wilkes J., Evans RM., Olefsky J. (2003) Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. Nat Med 9, 1491-1497.

Hesselink, M. K., Mensink, M. & Schrauwen, P. (2003). Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. Obes Res 11, 1429-1443.

Hill, J. O. (2006). Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. Endocr Rev 27, 750-761.

Hill, J. O., Wyatt, H. R., Reed, G. W. & Peters, J. C. (2003). Obesity and the environment: where do we go from here? Science 299, 853-855.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M. & Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature 420, 333-336.

Hocks J., Hesselink M.K., Sluiter W., Schaart G., Willems J., Marrison A., Clapham J.C., Saris W.H & Scharauwen P. (2006). The effect of high-fat feedind on intramuscular lipid and lipid peroxidation levels in UCP-3-ablated mice. FEBS lett, 580, 1371-1375.

Holden M.J. & Sze H. (1989). Plant Physiol. (Bethesda) 91, 1296-1302.

Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. Int J Obes Relat Metab Disord 24 Suppl 4, S23-27.

Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. In Int J Obes Relat Metab Disord, vol. 27 Suppl 3, pp. S53-55.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest 95, 2409-2415.

Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F. & Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alphaand obesity-induced insulin resistance. Science 271, 665-668.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91.

Houmard, J. A., Hortobagyi, T., Neufer, P. D., Johns, R. A., Fraser, D. D., Israel, R. G. & Dohm, G. L. (1993). Training cessation does not alter GLUT-4 protein levels in human skeletal muscle. J Appl Physiol 74, 776-781.

Houmard, J. A., Tyndall, G. L., Midyette, J. B., Hickey, M. S., Dolan, P. L., Gavigan, K. E., Weidner, M. L. & Dohm, G. L. (1996). Effect of reduced training and training cessation on insulin action and muscle GLUT-4. J Appl Physiol 81, 1162-1168.

Jansson, P. A., Pellme, F., Hammarstedt, A., Sandqvist, M., Brekke, H., Caidahl, K., Forsberg, M., Volkmann, R., Carvalho, E., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Wiklund, O., Yang, X., Taskinen, M. R. & Smith, U. (2003). A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin. Faseb J 17, 1434-1440.

Jarmuszkiewicz W., Navet R., Alberici LC., Douette P., Sluse-Goffart C.M., Sluse F.E., Vercesi A.E. (2004). Redox state of endogenous coenzyme q modulates the inhibition of linoleic acid-induced uncoupling by guanosine triphosphate in isolated skeletal muscle mitochondria. J Bioenerg Biomembr. 36, 493-502.

Kahn, C. R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes 43, 1066-1084.

Kahn, S. E. (2001a). Beta cell failure: causes and consequences. Int J Clin Pract Suppl, 13-18.

Kahn, S. E. (2001b). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 86, 4047-4058.

Kaplan R.S & Pedersen P.L. (1983). Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mithocondria. Biochem J 212, 279-288.

Karacabey, K. (2005). Effect of regular exercise on health and disease. Neuro Endocrinol Lett 26, 617-623.

Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K., Fujii, M., Tsuchihashi, K., Goto, H., Nakatani, K. & Yano, Y. (1998). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 83, 859-862.

Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V. & Ritov, V. B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes 51, 2944-2950.

Kershaw, E. E. & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 89, 2548-2556.

Khovidhunkit, W., Kim, M. S., Memon, R. A., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Feingold, K.R. & Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. J Lipid Res 45, 1169-1196.

Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z. W., Karin, M., Perret, P., Shoelson, S. E. & Shulman, G. I. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. J Clin Invest 108, 437-446.

Kim, Y. B., Nakajima, R., Matsuo, T., Inoue, T., Sekine, T., Komuro, M., Tamura, T., Tokuyama, K. & Suzuki, M. (1996). Gene expression of insulin signal-transduction pathway intermediates is lower in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower oil diet. Metabolism 45, 1080-1088.

King, D. S., Dalsky, G. P., Clutter, W. E., Young, D. A., Staten, M. A., Cryer, P. E. & Holloszy, J. O. (1988). Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. J Appl Physiol 64, 1942-1946.

Klingenberg, M. (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. J Bioenerg Biomembr 31, 419-430.

Kretschmer, B. D., Schelling, P., Beier, N., Liebscher, C., Treutel, S., Kruger, N., Scholz,H. P. & Haus, A. (2005). Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. Life Sci 76, 1553-1573.

Kriska, A. M., LaPorte, R. E., Pettitt, D. J., Charles, M. A., Nelson, R. G., Kuller, L. H., Bennett, P. H. & Knowler, W. C. (1993). The association of physical activity with obesity, fat distribution and glucose intolerance in Pima Indians. Diabetologia 36, 863-869.

Kujala, U. M., Kaprio, J., Taimela, S. & Sarna, S. (1994). Prevalence of diabetes, hypertension, and ischemic heart disease in former elite athletes. Metabolism 43, 1255-1260.

Kump, D. S. & Booth, F. W. (2005). Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. J Physiol 562, 829-838.

Lambert, E. V., Wooding, G., Lambert, M. I., Koeslag, J. H. & Noakes, T. D. (1994). Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. J Appl Physiol 77, 2564-2571.

Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J. & White, M. F. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. J Biol Chem 278, 2896-2902.

Levy, J., Atkinson, A. B., Bell, P. M., McCance, D. R. & Hadden, D. R. (1998). Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. Diabet Med 15, 290-296.

Lingohr, M. K., Buettner, R. & Rhodes, C. J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? Trends Mol Med 8, 375-384.

Lowell, B. B., V, S. S., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P. & Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. Nature 366, 740-742.
Luciano, E., Carneiro, E. M., Carvalho, C. R., Carvalheira, J. B., Peres, S. B., Reis, M. A., Saad, M. J., Boschero, A. C. & Velloso, L. A. (2002). Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. Eur J Endocrinol 147, 149-157.

MacEwan, D. J. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. In Cell Signal, vol. 14, pp. 477-492.

Margareto, J., Marti, A. & Martinez, J. A. (2001). Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma. J Nutr Biochem 12, 130-137.

Marti, B. & Howald, H. (1990). Long-term effects of physical training on aerobic capacity: controlled study of former elite athletes. J Appl Physiol 69, 1451-1459.

Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28, 412-419.

Mayer, J. (1953). Decreased activity and energy balance in the hereditary obesity-diabetes syndrome of mice. Science 117, 504-505.

Mayer-Davis, E. J., D'Agostino, R., Jr., Karter, A. J., Haffner, S. M., Rewers, M. J., Saad, M. & Bergman, R. N. (1998). Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Jama 279, 669-674.

Melzer, K., Kayser, B., Saris, W. H. & Pichard, C. (2005). Effects of physical activity on food intake. Clin Nutr 24, 885-895.

Medeiros A., Gianolla R.M., Kalli L.M.P., Bacuarau R.F.P., Rosa L.F.B.C., Negrão C.E., Brum P.C. (2000). Efeito do treinamento físico de natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. Rev Paul Educ Físic. 14, 7-15.

Millet, L., Vidal, H., Andreelli, F., Larrouy, D., Riou, J. P., Ricquier, D., Laville, M. & Langin, D. (1997). Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. J Clin Invest 100, 2665-2670.

Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C. P., Digby, J., Byrne, C. D. & O'Rahilly, S. (1998). Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. Diabetes 47, 1384-1391.

Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D. & Groop, L. C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet 34, 267-273.

Murgatroyd, P. R., Goldberg, G. R., Leahy, F. E., Gilsenan, M. B. & Prentice, A. M. (1999). Effects of inactivity and diet composition on human energy balance. Int J Obes Relat Metab Disord 23, 1269-1275.

Muzzin, P., Boss, O. & Giacobino, J. P. (1999). Uncoupling protein 3: its possible biological role and mode of regulation in rodents and humans. J Bioenerg Biomembr 31, 467-473.

Nieman, D. C. & Pedersen, B. K. (1999). Exercise and immune function. Recent developments. Sports Med 27, 73-80.

Noland, R. C., Hickner, R. C., Jimenez-Linan, M., Vidal-Puig, A., Zheng, D., Dohm, G. L. & Cortright, R. N. (2003). Acute endurance exercise increases skeletal muscle uncoupling protein-3 gene expression in untrained but not trained humans. Metabolism 52, 152-158.

Nordfors, L., Hoffstedt, J., Nyberg, B., Thorne, A., Arner, P., Schalling, M. & Lonnqvist, F. (1998). Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects. Diabetologia 41, 935-939.

Oberkofler, H., Liu, Y. M., Esterbauer, H., Hell, E., Krempler, F. & Patsch, W. (1998). Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. Diabetologia 41, 940-946.

O'Donovan, G., Kearney, E. M., Nevill, A. M., Woolf-May, K. & Bird, S. R. (2005). The effects of 24 weeks of moderate- or high-intensity exercise on insulin resistance. Eur J Appl Physiol 95, 522-528.

Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E. J., Goldfine, A. B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C. R. & Mandarino, L. J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 8466-8471.

Pauli, J. R., Gomes, R. J. & Luciano, E. (2006). [Hypothalamo-pituitary axis: effects of physical training in rats administered with dexamethasone]. Rev Neurol 42, 325-331.

Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H. & Zick, Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 272, 29911-29918.

Pedersen, S. B., Borglum, J. D., Kristensen, K., Norrelund, H., Otto, J., Jorgensen, L. & Richelsen, B. (2000). Regulation of uncoupling protein (UCP) 2 and 3 in adipose and muscle tissue by fasting and growth hormone treatment in obese humans. Int J Obes Relat Metab Disord 24, 968-975.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. & Goeddel, D. V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature 312, 724-729.

Peres, S. B., de Moraes, S. M., Costa, C. E., Brito, L. C., Takada, J., Andreotti, S., Machado, M. A., Alonso-Vale, M. I., Borges-Silva, C. N. & Lima, F. B. (2005). Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. J Appl Physiol 98, 1037-1043.

Perreault, M. & Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. Nat Med 7, 1138-1143.

Peters, J. C., Wyatt, H. R., Donahoo, W. T. & Hill, J. O. (2002). From instinct to intellect: the challenge of maintaining healthy weight in the modern world. Obes Rev 3, 69-74.

Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L., DiPietro, L., Cline, G. W. & Shulman, G. I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. Science 300, 1140-1142.

Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 350, 664-671.

Petibois, C., Cassaigne, A., Gin, H. & Deleris, G. (2004). Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. J Clin Endocrinol Metab 89, 3377-3384.

Pickup, J. C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care 27, 813-823.

Porte, D., Jr. & Kahn, S. E. (2001). beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. Diabetes 50 Suppl 1, S160-163.

Prada, P. O., Zecchin, H. G., Gasparetti, A. L., Torsoni, M. A., Ueno, M., Hirata, A. E., Corezola do Amaral, M. E., Hoer, N. F., Boschero, A. C. & Saad, M. J. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology 146, 1576-1587.

Prada, P.O., Pauli, J.R., Ropelle, E.R., Zecchin H.G., Carvalheira J.B.C., Velloso, L.A., Saad M.A.J. (2006). Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. FEBS Letters 580, 4889-4894.

Rajala, M. W. & Scherer, P. E. (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. Endocrinology 144, 3765-3773.

Ribon, V., Herrera, R., Kay, B. K. & Saltiel, A. R. (1998). A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. J Biol Chem 273, 4073-4080.

Ricquier, D. & Bouillaud, F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. J Physiol 529 Pt 1, 3-10.

Ricquier, D. & Kader, J. C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a soidum dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. Biochem Biophys Res Commun 73, 577-583.

Rodnick, K. J., Haskell, W. L., Swislocki, A. L., Foley, J. E. & Reaven, G. M. (1987). Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. Am J Physiol 253, E489-495.

Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Prada, P. O., de Souza, C. T., Picardi, P. K., Faria, M. C., Cintra, D. E., Fernandes, M. F., Flores, M. B., Velloso, L. A., Saad, M. J. & Carvalheira, J. B. (2006). Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. J Physiol 577, 997-1007.

Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M., Bouillaud, F. & Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. Diabetes 53 Suppl 1, S130-135.

Saad, M. J., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P. L., White, M. F. & Kahn, C. R. (1992). Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. J Clin Invest 90, 1839-1849.

Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414, 799-806.

Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A. G. (1998). Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? Diabetes 47, 1693-1698.

Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A. G. (1999). Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance. Diabetes 48, 436-441.

Samec, S., Seydoux, J., Russell, A. P., Montani, J. P. & Dulloo, A. G. (2002). Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPARgamma and key enzymes of lipid oxidation. Pflugers Arch 445, 80-86.

Sandretto, A. M. & Tsai, A. C. (1988). Effects of fat intake on body composition and hepatic lipogenic enzyme activities of hamsters shortly after exercise cessation. Am J Clin Nutr 47, 175-179.

Savage, D.B., Petersen K.F & Shulman GI. (2007). Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. Hypertension 45, 828-833.

Schemmel, R., Mickelsen, O. & Gill, J. L. (1970). Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. J Nutr 100, 1041-1048.

Schrauwen, P. & Hesselink, M. (2003). Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited. Proc Nutr Soc 62, 635-643.

Schrauwen P., Russel A.P., Moonen-Kornips E., Boon N., Hesselink M.K.C. (2005). Effect of 2 weeks of endurance training on uncoupling protein 3 content in untrained human subjects. Acta Physiol Scand 183, 273-280.

Schrauwen, P. & Hesselink, M. K. (2004). The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? Proc Nutr Soc 63, 287-292.

Schrauwen, P., Hesselink, M. K., Vaartjes, I., Kornips, E., Saris, W. H., Giacobino, J. P. & Russell, A. (2002). Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolismmediated effect. Am J Physiol Endocrinol Metab 282, E11-17.

Schrauwen, P., Hesselink, M. K., Blaak, E. E., Borghouts, L. B., Schaart, G., Saris, W. H. & Keizer, H. A. (2001). Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes 50, 2870-2873.

Schrauwen P., Saris W.H & Hesselink M.K. (2001). An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. FABEB J, 15, 2497-2502.

Schrauwen, P., Walder, K. & Ravussin, E. (1999). Human uncoupling proteins and obesity. Obes Res 7, 97-105. Schrauwen-Hinderling, V. B., Kooi, M. E., Hesselink, M. K., Jeneson, J. A., Backes, W. H., van Echteld, C. J., van Engelshoven, J. M., Mensink, M. & Schrauwen, P. (2007). Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. Diabetologia 50, 113-120.

Schulz, L. O. & Schoeller, D. A. (1994). A compilation of total daily energy expenditures and body weights in healthy adults. Am J Clin Nutr 60, 676-681.

Shepherd, P. R., Nave, B. T. & Siddle, K. (1995). Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. Biochem J 305 (Pt 1), 25-28.

Shoelson, S. E., Lee, J. & Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NFkappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. In Int J Obes Relat Metab Disord, vol. 27 Suppl 3, pp. S49-52.

Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 106, 171-176.

Shulman, G. I. (2004). Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. Physiology (Bethesda) 19, 183-190.

Simsolo, R. B., Ong, J. M. & Kern, P. A. (1993). The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. J Clin Invest 92, 2124-2130.

Stein, C. J. & Colditz, G. A. (2004). The epidemic of obesity. J Clin Endocrinol Metab 89, 2522-2525.

Teran-Garcia, M., Rankinen, T., Koza, R. A., Rao, D. C. & Bouchard, C. (2005). Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab 288, E1168-1178.

Thompson, M. P. & Kim, D. (2004). Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. FEBS Lett 568, 4-9.

Tilg, H. & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 6, 772-783.

Tonkonogi M. & Sahlin K. (1997) Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. Acta Physiol Scand. 161: 345-53.

Tsuboyama-Kasaoka, N., Tsunoda, N., Maruyama, K., Takahashi, M., Kim, H., Ikemoto, S. & Ezaki, O. (1998). Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. Biochem Biophys Res Commun 247, 498-503.

Tuttle, H. A., Davis-Gorman, G., Goldman, S., Copeland, J. G. & McDonagh, P. F. (2004). Proinflammatory cytokines are increased in type 2 diabetic women with cardiovascular disease. J Diabetes Complications 18, 343-351.

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. Nature 389, 610-614.

Ventre, J., Doebber, T., Wu, M., MacNaul, K., Stevens, K., Pasparakis, M., Kollias, G. & Moller, D. E. (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. Diabetes 46, 1526-1531.

Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J. S. & Lowell, B. B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun 235, 79-82.

Vidal-Puig, A., Grujic D., Zhang G.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., et al. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. J. Biol Chem, 275, 16258-16266.

Viatour P., Merville M.P., Bours V & Chariot A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins : implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci 30, 43-52.

Voltarelli F.A., Gobatto C.A., Mello M.A.R. (2002). Determination of anaerobic thereshold in rats using the lactate minimum test. Braz J Med & Biol Res 35, 1389-1394. Walberg, J. L., Greenwood, M. R. & Stern, J. S. (1983). Lipoprotein lipase activity and lipolysis after swim training in obese Zucker rats. Am J Physiol 245, R706-712.

Wannamethee, S. G. & Shaper, A. G. (1999). Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. Diabetes Care 22, 1266-1272.

Warne, J. P. (2003). Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. J Endocrinol 177, 351-355.

Weigle, D. S., Selfridge, L. E., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Cummings, D. E., Havel, P. J., Kuijper, J. L. & BeltrandelRio, H. (1998). Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. Diabetes 47, 298-302.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest 115, 1111-1119.

White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Mol Cell Biochem 182, 3-11.

Winkler, G., Salamon, F., Salamon, D., Speer, G., Simon, K. & Cseh, K. (1998). Elevated serum tumour necrosis factor-alpha levels can contribute to the insulin resistance in Type II (non-insulin-dependent) diabetes and in obesity. Diabetologia 41, 860-861.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 112, 1821-1830.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M. & Shoelson, S. E. (2001a). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. Science 293, 1673-1677.

Zimmet, P., Alberti, K. G. & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 414, 782-787.

## 8- ANEXOS

## EFFECTS OF DETRAININIG AND HIGH-FAT DIET ON MOLECULAR MECANISMS OF THE INDUCED OBESITY AND INSULIN RESISTANCE.

Pauli JR<sup>1</sup>; Cintra DE<sup>1</sup>; Ropelle ER<sup>1</sup>; Moraes JC<sup>1</sup>; De Souza CT<sup>1</sup>; Velloso LA<sup>1</sup>; Carvalheira JBC<sup>1</sup>; Saad MJA<sup>1</sup>.

Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil<sup>1</sup>.

Please address correspondence to: Mario José Abdalla Saad, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brasil, 13081-970, Fax: +55 19 37888950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.com.br

RUNNING TITLE: Detraining, obesity and insulin resistance.

KEYWORDS: Detraining, insulin signaling, inflammatory pathway and UCP-3

Abbreviations used are: Akt, protein kinase B/Akt; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; UCP-3, uncoupling protein.

## Introduction

Exercise training is often recommended in prevention and treatment of obesity. Chronic physical exercise increases rates of insulin-stimulated glucose transport in normal rodent in different tissues (muscle and fat), as well normalizes glucose transport in high fat diet-induced insulin resistant rodent (Rodnick et al., 1987; Goodyear & Kahn, 1998; Peres et al., 2005; Ropelle et al., 2006). On the other hand, the termination of exercise training (detraining) results in rapid fat accretion, weight gain and insulin resistance in both humans (Marti & Howald, 1990; Kujala et al., 1994) and rats (Craig et al., 1983; Applegate & Stern, 1987; Lambert et al., 1994). However, the exact mechanisms by which trained rats, during the detraining period, gained weight more rapidly than did their sedentary counterparts is not yet know. We and others have shown that in rats feeding with a high-fat diet (HFD) the development of insulin resistance is tissue-specific with reductions in insulin signaling through IR/IRSs/PI 3-K/Akt pathway in muscle, liver and hypothalamus, but not in adipose tissue which also have an increased in CAP/Cbl pathway (Prada et al., 2005; Prada et al., 2006). Whether the development of insulin resistance in detraining rats is more severe in muscle and/or involves different mechanisms of insulin resistance, and whether adipose tissue is also protected from alterations in insulin signaling in this model of obesity were not yet investigated. Moreover, we investigated the effects of long-term consumption of hyperlipidic diet in rats detrained on the expression of several inflammatory cytokines such c-Jun N-terminal kinase (JNK) and nuclear factor-kB (NFkB) which leads to impaired functional and molecular of the insulin-signaling, which is paralleled by increased serine phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1.

Regarding skeletal muscle, recent experiments have shown that mitochondrial oxidative phosphorylation activity and expression of genes involved in this process are reduced in muscle of insulin-resistance patients suffering from obesity and type 2 diabetes (Petersen et al., 2003; Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003; Petersen et al., 2004). In addition to a role of visceral fat in the etiology of insulin resistance, decreased muscle fat oxidation can favor the intramyocellular accumulation of fatty acid matabolities which can lead to deterioration of the insulin signaling (Petersen et al., 2004). Is possible that

down-regulation of UCP-3 expression might also contribute to the rapid weight gain known to occur when exercise training ceased.

Beyond such correlations, genetic variants, and UCP-3 modulation by fat acid (FA), direct evidence indicates that FA oxidation (FAO) capacity is increased by UCP-3 when measured in vitro in cultured cells, skeletal muscle, or isolated mitochondria from muscle of mice overexpressing UCP-3. Indeed, intramuscular triglyceride (IMTG) storage in the cytosol was decreased in UCP-3 overexpressing mice. From these findings emerged the hypothesis that increased uncoupling or increased energy expenditure (via FAO) could both be implicated in UCP-3-derived whole-body energy balance and decreased IMTG, that provide such possible primary event in the development of insulin resistance in the skeletal muscle. Thus, increases in tissue triglyceride content that correlate with decreases in insulin action and activation of IRS-associated PI(3)K and activation of PKC and/or IkB kinase and serine phosphorylation of the insulin receptor and its substrates might be important. However, in detraining animals' models the sequence of events leading to obesity and insulin resistance was not investigated.

Therefore, in the present work we used HFD in sedentary and detrained rats to study the sequence of events leading to modulation of insulin signaling in liver, muscle and adipose tissue of these animals, and parallel we also investigate expression and activity of the UCP-3 on the skeletal muscle in these animals, trying to understand the molecular mechanisms why the detrained on HFD gain more weight than their sedentary controls.

## Materials and methods

## Antibodies, chemicals and buffers

Male Wistar rats were provided by the State University of Campinas – Central Breeding Center (Campinas, SP, Brazil). Anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -PY), anti-IR $\beta$  ( $\alpha$ -IR), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-IRS-3, anti-c-Cbl ( $\alpha$ -Cbl), anti-CAP ( $\alpha$ -CAP), anti-Akt <sup>1</sup>/<sub>2</sub>, anti-phospho-C3G, anti-GLUT 4, anti-JNK, anti-phospho-JNK, anti-phospho-c-Jun, anti-IkB $\alpha$ , anti-UCP3 antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho-Akt [ser 473] antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly.

MA, USA). The p85 subunit of PI(3)K and anti-phosphoserine-IRS-1 (serine 307) were from Upstate Biotechnology (Upstate Biotechnology, NY, USA). Human recombinant insulin was from Eli Lylli and Co. (Indianapolis, IN, USA). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless specified elsewhere.

### Experimental animals and research protocols

All experiments were conducted in accordance with the principles and procedures described by the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee. The animals were maintained on 12-h artificial light-dark cycle and housed in individual cages. After the acclimatizing period (3 days), the animals were randomly divided into four experimental groups (n=8) with similar body weight ( $250 \pm 5g$ ): Control Wister rats fed with standard rodent chow (C), Sedentary Wister fed with standard rodent chow (weeks 1-8) and fed with fat-rich chow (weeks 9-16) (S-HFD) (component of high-fat diet see ref 1), Detrained Wister rats fed with standard rodent chow (weeks 1-8) and fed with fat-rich chow (see also ref 1) (weeks 9-16) (D-HFD) and Detrained Wistar rats fed with standard rodent chow (D-DC). All groups of animals had unlimited access to water.

## The physical exercise protocol

The training sessions were performed during the rat's light cycle and consisted of five day/week swimming sessions of 60-min duration for 8 weeks in an apparatus adapted for rats containing warmed water (34-35°C). Exercise duration and workload were increased gradually until the rats could swim for 60 min wearing caudal dumbbells weighing 5% of their body weight. Thereafter, duration and workload were constant. Sedentary rats placed in the swimming apparatus for 10 min twice a week to mimic the water stress associated with the experimental protocol. This swimming protocol has been characterized previously as low to moderate intensity and long duration due to improvement in muscle oxidative capacity (Luciano et al., 2002, Voltarelli et al., 2002).

The program of swimming persisted during a period of 8 weeks (weeks 1-8) and subsequently the rats (D-HFD and D-DC) stop the training (period of detraining) (weeks 9-16).

### Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

An ipGTT was performed at the end of the experimental period. After an overnight fast, the rats were anesthetized. After collection of an unchallenged sample (time 0), a solution of 20% glucose was administered into the peritoneal cavity Blood samples were collected from the tail at 15, 30, 60 and 120 min for determination of glucose and insulin concentrations. Plasma glucose was determined using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, USA). Plasma was separated by centrifugation (1100g) for 15 min at 4°C and stored at -80°C until assayed. Radioimmunoassay was employed to measure serum insulin level, according to a previous description (Scott et al. 1981).

## Insulin tolerance test (ITT)

Insulin (1.5 IU/Kg body weight) was administered by i.p. injection and blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes for serum glucose determination. The rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula 0.693/ (t1/2). The plasma glucose t1/2 was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of declive (Bonora et al., 1989).

## **Tissue extracts**

After a 6-h fast, control, S-HFD, D-HFD and D-DC rats were anesthetized intraperitonealy with sodium thiopental (80 mg/kg body weight) and used as soon as they were fully anesthetized (loss of pedal and corneal reflexes). The abdominal cavity was

opened, the portal vein exposed, and 60µg insulin or saline were injected. After 30 s, the liver was removed, minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilisation buffer (10,1/1 Triton-X 100, 100 mmol/l Tris pH 7.4, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) operated at maximum speed for 20 s. Approximately 90 s after the insulin or saline injection, hindlimb muscle and adipose tissue samples were excised and homogenized as described above. The tissue extracts were centrifuged at 11.000 g at 4°C for 30 min, and the supernatants used as sample.

### Protein analysis by immunobloting

For immunoprecipitation the supernatants were incubated overnight at 4°C with antibodies against IR, IRS-1, IRS-2, IRS-3 and CAP, followed by the addition of protein Asepharose 6 MBq. The samples (immunoprecipitated proteins and total extracts) were treated with Laemmli buffer containing 100 mmol/l DTT, heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8% SDS-PAGE in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean; Bio-Rad). The prestained molecular was standards used were myosin (205 Mr), galactose (11Mr), BSA (80 Mr) and ovalbumin (49.5 Mr). Electrotranfer of protein from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) as described by Trinder 1959, but with 0.02% SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol added to the transfer buffer to enhance the elution of high-molecular-mass proteins. The non-specific binding protein to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter for 2h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dried milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated for 4 h at 22°C with antibodies against phosphotyrosine, IR, IRS-1, IRS-2, IRS-3, Cbl or the p85 subunit of PI(3)K diluted in blocking buffer without milk. The blots were incubated with 0.074 MBq of [125] protein A (1.11 MBq/µg) in 10 ml of blocking buffer (1% non-fat dried milk) for 2 h at 22°C and washed again as described above. [125] Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using prelashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) with a Cronex Lightining Plus

intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE, USA) at -80°C for 12 to 48 h. Images of the developed autoradiographs were scanned (Hewlett Packard Scanjet 5P) and band intensities were quantitated by optical densitometry (Scion Image Corporation) of the developed autoradiographs that were used at exposures in the linear range. For IR, IRS-1, IRS-2, IRS-3, Cbl, CAP, Glut4, IRS1-Ser307, IkB, phospho-C3G, phospho-Akt, phospho-JNK, phospho-c-jun, UCP-3 quantitation in either tissue total extract samples (250 µg protein) were subjected to SDS-PAGE with no previous immunoprecipitation. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. Quantitative analysis was performed as described above.

## Other assays

Protein quantification was performed using Bradford method. The weight body and mean 24-h food intake of the animals was evaluated every week. For purpose of clarity, three times per week food take was averaged and presented as a single data point per week. Food consumption was calculated by measuring the difference in mass between weighed portions and uneaten food, including the spillage onto wire mash screens situated below each cage. Fecal matter was separated from the food. At the end of the experimental period, the rats were anesthetized as described above, the abdominal cavity opened, and the entire epididymal and perirenal fat pad carefully dissected and weighed. Glucose levels were measured by the glucose oxidase method, plasma insulin and leptin were determined, by radioimmunoassay using rat standard after 6-h fast.

## Isolation of skeletal muscle mitochondria

Muscle mitochondria were from hidlimb skeletal muscle by homogenization in ice-cold medium containing 100 mM sucrose, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM  $K_2$ HPO<sub>4</sub>, 0.1 mM EGTA, and 0.2% BSA, pH 7.4, followed by differential centrifugation (40). The final mitochondrial pellet was resuspended in ice cold storage buffer containing 0.2 M mannitol, 0.1 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.1 Mm EDTA, at pH 7.4. The protein concentration was usually around 30-40 mg/mL, as determined by a modified Biuret

method (41). The presence of fatty acid-free BSA (0.2%) in the buffers throughout the isolation procedure completely depleted the mitochondria of endogenous fatty acids.

Ver metodologia IMTG e unidade.

## Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. accompanied by the indicated number of independent experiments. For statistical analysis, the groups were compared using t test or one-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level significance adopted was P < 0.05.

## Results

## Physiological and metabolic parameters

In Table 1 shows comparative data regarding controls (C), sedentary rats fed a high-fat diet (S-HFD), detrained rats fed a high-fat diet (D-HFD) and detrained control rats fed a standard rodent chow (D-DC). S-HFD and D-HFD groups had a greater body weight than age-matched controls (C and D-DC). Animal's detrained group (D-HFD) obtained more gain in body weight when compared to S-HFD group in the end of experiment. The D-HFD animals had higher blood glucose levels than C and D-DC groups of the animals. Although, the blood glucose levels were similar between control and S-HFD and also between D-DC and S-HFD groups. The blood insulin levels were higher in S-HFD and D-HFD than controls rats. When evaluated the blood leptin levels were obtained significant difference again in the animals fed with a high-fat diet (S-HFD and D-HFD) compared to C and D-DC animals. Interesting, leptin levels of the D-HFD rats was significantly higher than S-HFD rats.

## Animal characteristics

The clinical and laboratory data of control, S-HFD, D-HFD and D-DC rats are summarized in Figure 1. There were differences in body weight between animals fed with a high-fat diet and animals fed with a standard rodent chow. High-fat diet induced a greater gain body weight when compared to rats C and D-DC. Although, in the weeks 14<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> the D-HFD rats to show higher gain of the body weight compared with S-HFD rats in the same period (A). The mean weekly in 24 hours food intake were not different into four groups during weeks 1<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> (data not show). Both detraining and fat-rich feeding not promote significant changes in mean weekly in 24 hours food intake during weeks 9<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> (B).

During the ipGTT the levels of blood glucose of S-HFD and D-HFD rats were constantly higher than the level of the control and D-DC rats. The area under the glucose curve also was significantly higher for rats fed with a high-fat diet (S-HFD and D-HFD), when compared with C and D-DC rats. The blood insulin levels were higher in S-HFD and D-HFD rats at time 15' when compared with control animals. During the remainder of the test, the blood insulin levels were similar between all groups of the animals and, again the area under the insulin curve was higher for S-HFD and D-HFD rats compared with C and D-DC rats. Furthermore, the disturbance in the glucose disappearance rate (Kitt), induced by rich-fat diet was observed in both groups S-HFD and D-HFD to compare control rats (C and D-DC), but was observed lesser glucose consumption in D-HFD than S-HFD rats after 8 weeks of the feeding with a high-fat diet.

Animals D-HFD and S-HFD obtained more gain in epididymal fat and perirenal fat when compared to C and D-DC rats after 8 weeks of the feeding with a high-fat diet. Furthermore, the detrained rats obtained more gain in fat tissues (epididymal and perirenal) in the end of the experiment than S-HFD rats.

## Insulin signaling in the liver tissue of controls (C), sedentary fed with a high-fat diet (S-HFD), detrained fed with a high-fat diet (D-HFD) and detrained control (D-DC).

Figure 2 depicts the consequence of high-fat diet and detrained on the early steps of the insulin signaling pathway in the liver. However, there was a similar reduction (40-50%) in insulin-induced IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation levels (Fig. 2A, B, D), in IRS-1/PI3K and IRS-2/PI3K association (Fig. 2C, E) and also in insulin-induced Akt serine phosphorylation (Fig. 2F) in S-HFD and in D-HFD groups when compared with control rats.

## Insulin signaling in the muscle tissue of controls (C), sedentary fed with a high-fat diet (S-HFD), detrained fed with a high-fat diet (D-HFD) and detrained control (D-DC).

Figure 3 depicts the consequence of high-fat diet and detrained on the early steps of the insulin signaling pathway in the muscle. However, there was a similar reduction (40-50%) in insulin-induced IR, and IRS-2 tyrosine phosphorylation levels (Fig. 3A, D), in IRS-2/PI3K association (Fig. 3E) in S-HFD and in D-HFD groups when compared with control rats. On the other hand, in D-HFD there was a more marked reduction in insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation levels, in IRS-1/PI3K association and in insulin-induced Akt phosphorylation compared to S-HFD group of the animals (Fig. 3B, C, F).

# Insulin signaling in the white adipose tissue (WAT) of controls (C), sedentary fed with a high-fat diet (S-HFD), detrained fed with a high-fat diet (D-HFD) and detrained control (D-DC).

Figure 3 depicts the consequence of high-fat diet and detrained on the early steps of the insulin signaling pathway in the WAT tissue. However, there was a similar reduction (40-50%) in insulin-induced IR tyrosine phosphorylation levels (Fig. 4A) in S-HFD and in D-HFD group when compared with control rats. On the other hand, in S-HFD there was a more marked reduction in insulin-induced IRS-1, IRS-2 and IRS-3 levels (Fig. 4B, D, F) and in IRS1/PI3K, IRS2/PI3K and IRS-3/PI3K association and also in insulin-induced Akt serine phosphorylation (Fig. 4C, E, G, H) compared to D-HFD rats.

# The CAP/Cbl pathway in the white adipose tissue (WAT) of controls (C), sedentary fed with a high-fat diet (S-HFD), detrained fed with a high-fat diet (D-HFD) and detrained control (D-DC).

There was an increased in expression of the Cbl (32% and 62%) and in expression of the CAP (45% and 75%) in adipose tissue for S-HFD and in D-HFD groups, respectively, when compared to control rats. On the other hand in D-HFD there was a more marked increased compared to S-HFD rats. There also an increase in insulin-stimulated

c-Cbl tyrosine phosphorylation (41% and 51%), and in CAP/Cbl association (25% and 83%) in adipose tissue for S-HFD and D-HFD groups, respectively, when compared to control rats. In addition, D-HFD there was a more marked increased c-Cbl tyrosine phosphorylation and CAP/Cbl association when insulin-stimulated than S-HFD rats. We also observed an increase in insulin-stimulated C3G tyrosine phosphorylation (32% and 93%) in adipose tissue for S-HFD and D-HFD groups, respectively, when compared to control rats. There also an increase significantly in C3G tyrosine phosphorylation for D-HFD rats than S-HFD rats. Finally, there was an insulin-dependent increase of GLUT4 protein expression (10% and 27%) for S-HFD and D-HFD groups, respectively, compared to control rats. However, also observed an increase statistically significantly in GLUT4 protein expression in D-HFD animals compared to S-HFD animals.

## Detraining and high-fat diet increase Ser<sup>307</sup> phosphorylation of IRS-1 in liver, muscle and white adipose tissue (WAT) in Wistar rats.

Among the serine residues that become phosphorylated in response to risk factors of insulin resistance, Ser 307 has been studied extensively and Ser 307 phosphorylation has become a molecular indicator of insulin resistance (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997; Aguirre et al 2002, Hirosumi et al 2002, Lee et al. 2003), but the effect of detraining on IRS-1 serine phosphorylation in rats has not been identified. To address this tissue, we tested Ser 307 phosphorylation in the gastrocnemius muscle of controls, S-HFD, D-HFD, D-C rats. As shown in Fig. 6 (upper panels), there was a significant increased in IRS-1 serine phosphorylation levels in the liver, muscle and WAT of S-HFD and D-HFD rats when compared with control and DC rats. However, in D-HFD there was a more marked increase in IRS-1 serine phosphorylation levels in the muscle compared to S-HFD rats.

## Detraining and high-fat diet increses JNK activity in liver, muscle and white adipose tissue (WAT) in Wistar rats.

JNK activation was determined by monitoring phosphorylation of JNK (Thr 183 and Tyr 185) and c-Jun (ser 63), which is a substrate of JNK. There was an increase in JNK phosphorylation in the liver, muscle and WAT tissue of S-HFD and D-HFD rats when compared with control and D-DC rats (Fig. 6 upper panels). Consistent with JNK activation, c-Jun phosphorylation was high increased in the liver, muscle and WAT tissue of S-HFD and D-HFD rats when compared with control and D-DC rats (Fig. 6 meddle panels). However, interestingly, in the D-HFD animals there was more increased JNK phosphorylation in the muscle when compared with S-HFD animals.

## Detraining and high-fat diet increase phosphorylation and degradation IkBα in liver, muscle and white adipose tissue (WAT) in Wistar rats.

Finally, we examined the IKK/ NF-KB pathway, an important regulator of inflammation, in obese-and inflammation-induced insulin resistance. The main function of the IKK complex is the activation of NF-KB through phosphorylation and degradation IkBα (Hevener et al., 2003; Greten et al., 2004; Viatour et al., 2005). Thus, to assess NF-KB activation, we observed IkBα degradation in the liver, muscle and WAT tissue of controls, S-DHF, D-HFD and D-C rats. There were a decreased of IkBα expression levels in the liver, muscle and WAT tissue of S-HFD and D-HFD rats, compared with control and D-DC rats. (Fig. 6 lower panels). However, interestingly, again in D-HFD rats there was a more decreased of IkBα expression levels in the muscle compared to S-HFD rats.

## Falta inserir os dados referentes a UCPs

## 4. Discussion

Studies in humans and animal models show that the cessation of exercise training causes an enhanced in body mass and rapid body fat accretion (Walberg et al., 1983; Applegate & Stern, 1987; Eckel & Yost, 1987; Almeras et al., 1997). In the present

student we magnify the increase in body weight with detraining by treating the animals with a HFD. However, detraining has also been associated with increased food intake, especially in rats genetically predisposed to obesity. Thus, it has been difficult to separate refeeding effects from alterations resulting from cessation of exercise training (Schemmel et al., 1970; Applegate & Stern, 1987)). In the present study, did not observe an increased in food intake with detraining, which thus dissociated a possible refeeding response from the effects of removing the exercise stimulus, Interestingly, the increased in weight gain and fat accretion that was observed in D-HFD rats when compared with S-HFD rats can be attributed to the cessation of training per se, and suggest that the cessation of exercise training causes an enhanced capacity for lipogenesis independent of changes in food energy intake. In according with our results, Lampert et al. showed that the ratio of weight gain in 1- and 2-wk detrained rats was significantly higher than that of sedentary control or trained rats and food intake was not different in any groups (Lambert et al., 1994).

Our results are in accordance with data in human studies. Marti and Howald observed that the increase in body fat in runners who almost entirely abandoned their running habits exceeded by about 10 kg that of runners who maintained their running over 15 years (Marti & Howald 1990). These results are concordant with data published by Giada et al. who showed, after a 2-month detraining, an increase of 2% and 4% of body fat in older and young cyclists, respectively (Giada et al., 1995) In accord, Alméras et al. demonstrated that the swimmers gained 4.3 kg of body fat that was equivalent to an increase of about 4 percent units of total body fatness for the 2-month rest period (Alméras et al., 1997).

However in these previous studies in rats or in humans, the molecular mechanisms that account for this more evident increase in body weight and fat accretion were not investigated. Our results show in the sedentary or in the detrained rats 15 days HFD was insufficient to change insulin signaling in liver, skeletal muscle and adipose tissue. However, the D-HFD rats presented higher content of the triglyceride in the muscle and decreased on UCP-3 protein activity and expression compared to their sedentary controls on the same diet, but the insulin sensitivity determined by Kitt did not show differences between the groups (after 15 days of HFD).

These results suggest that these mitochondrial adaptations might be early events in the development of obesity and insulin resistance in detrained animals, which became evident before the alterations in insulin sensitivity. In accordance with this mitochondrial adaptation there is in parallel an increased in activation of PKC in the skeletal muscle of D-HFD rats compared to S-HFD rats. The activated kinases phosphorylated serine residues on IRS-1 and inhibit insulin-induced PI 3-kinase activity, resulting in reduced insulinstimulated Akt activity.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy has shown a close correlation between intramyocellular triglyceride content and whole-body insulin resistance in patients with obesity and type 2 diabetes (Hwang JH & Stein DT 2001, J Appl Physiol 90, 1267-1274). Is possible that down-regulation of UCP-3 activity and expression in our study when exercise training ceased might to contributed with decreased FAO and increased IMTG stores resulted in increased expression of PKC and to rapid gain body-weight. Increased FAO rates and decreased IMTG in UCP-3 overexpression models provide convincing evidence to support the UCP-3 FA anion export model proposed by Himms-Hagen and Harper. In addition, evidence supporting a role for UCP-3 in body energy balance comes primarily from transgenic studies. Mice overexpression human UCP-3 have lower body weights than WT mice. Thus, an important implication of the reduced levels of UCP-3 in D-HFD rats might been associated with TGIM accumulation in skeletal muscle and reduced expensive energetic that could resulted in more gain body-weight, rapid accretion of the adipose mass and reduced insulin sensitivity in the beginning detraining.

Our data show 60 days of HFD in detrained (D-HFD) or in sedentary (S-HFD) animals induced similar impairment in insulin through IRSs/PI 3-K/Akt in liver tissue of these animals accompanied by an increased of IRS-1 serine phosphorylation. In muscle, in spite of a down regulation in insulin signaling in both groups on HFD, the reduction in insulin-induced IRS-1/PI 3-K/Akt pathway was more marked in detrained (D-HFD) and a more evident increase in IRS-1 serine phosphorylation. These data suggest that the insulin resistance in muscle of detrained (D-HFD) rats is more severe than in muscle of sedentary (S-HFD) rats on the same diet. This may be important, since in some situations of insulin

resistance, there is a reduction in IRS-1 expression in muscle, contributing to reduced insulin sensitivity.

Analogously, in fat we observed a decrease in insulin stimulated IR tyrosine phosphorylation that is accompanied by a decrease in the IRS-1, IRS-2 and IRS-1/PI3-K and IRS-2/PI3-K associations that lead to an decrease in Akt serine phosphorylation in WAT tissue of S-HFD and D-HFD compared with C and D-DC animals. Surprisingly, we observed that decreasing in insulin action is lesser in D-HFD compared with S-HFD rats. Furthermore, we observed an increase in Cbl phosphorylation, which parallels the increase in association of CAP-Cbl as well as an augmentation in CAP and Cbl protein expression in the adipose tissue of these animals. Previous study shown that endurance exercise training increased responsiveness of adipocytes to insulin and that this effect is exerted through the IRS/PI3-K/Akt pathway, at least in part, when available after 24 hours the last bout of exercise. For the other hands, high fat intake is associated with reduced glucose uptake in different tissues, characterized by reduced insulin sensitivity in liver, muscles, hypothalamus, but not in adipose tissue, at least during the first month of high-fat diet. Our laboratory in recent study show that, in adipose tissue of rats fed with high-fat diet, the reduction in insulin signaling, through IRS-1 and IRS-3, and the absence of any alteration in the IRS-2/Akt pathway contrasts with the ability of insulin to stimulate the CAP/Cbl/C3G pathway in the adipose tissue. Since this pathway may have an important role in glucose uptake in adipocytes, we may suggest that its increased activity, in parallel to an increase in insulin-induce GLUT4 in adipose tissue of detrained rats, may explain the increased adjpocytes of trained rats fed with high-fat diet submitted a period of cessation training to 8 weeks. Thus, more insulin sensitivity in the early steps of insulin pathway with the ability of insulin to stimulate the CAP/Cbl/C3G pathway in the adipose tissue of D-HFD rats resulted in more fat accumulation after training cessation.

Moreover, in this study, we observed that HFD lead an increased JNK activity, disappearance of IkB and higher IRS-1 phosphorylation at serine in muscle tissue of the detrained rats when compared to sedentary animals. JNK is a serine kinase that is responsible for activation of the transcription factors, c-JUN and ATF2, by phosphorylating these two proteins (Derijard et al., 1994; Minden et al., 1995). Recently, JNK has been

linked to the regulation of insulin signaling by several studies (Aguirre et al., 2000; Hirosumi et al., 2002; Aguirre et al., 2002; Lee et al., 2003). It is suggest that JNK contributes to insulin resistance by phosphorylation IRS-1 at serine 307, and this phosphorylation leads to inhibition of the IRS-1 function (Aguirre et al., 2000; Aguirre et al., 2002; Lee et al., 2003). The IKK $\beta$ /IkB/NFkB pathway may also contribute to induce insulin resistance. In this regard the reduction in IkB $\alpha$  protein expression may be an indirect measurement of the activity of this pathway. Our results showing a higher increase in JNK activity and a more marked reduction in IkB $\alpha$  protein expression in muscle of D-HFD are in accordance with a higher level of IRS-1 ser 307 phosphorylation and more evident reduction in insulin signaling in muscle of these animals compared to S-HFD.

## Referencias do artigo não contidas na tese.

- Derijard B., Hibi M., Wu I.H., Barret T., Su B., Deng T, Karin M & Davis R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell 76, 1025-1037.
- Minden A., Lin A., Claret F.X., Abo A & Karin M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. Cell 81, 1147-1157.

## Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats

Patrícia Oliveira Prada, José Rodrigo Pauli, Eduardo Rochete Ropelle, Henrique Gottardello Zecchin, José Barreto Campello Carvalheira, Lício Augusto Velloso, Mario José Abdalla Saad\*

Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas, FCM-UNICAMP, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

Received 25 July 2006; revised 28 July 2006; accepted 1 August 2006

Available online 10 August 2006

Edited by Barry Halliwell

Abstract A high-fat diet (HFD) is associated with reduced glucose uptake in muscle, but not in adipose tissue. In the present study, we investigated whether a HFD can modulate glucose uptake in adipose tissue by increasing signal transduction through the CAP/Cbl pathway, independently of the PI3-K/Akt pathway. Our results suggest that, in HFD, the differential regulation of insulin-induced glucose uptake between skeletal muscle and adipose tissue may, in part, be a consequence of the CAP/Cbl/C3G pathway, since the expression of CAP and Cbl, and also the activation of this pathway were increased in adipose tissue but not in muscle.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* High-fat diet; Adipose tissue; Skeletal muscle; Cbl; CAP; PI3-K; Akt; GLUT4; Rat

#### 1. Introduction

Over the last few years, it has been established that two pathways are necessary for insulin-stimulated glucose transport; a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)-dependent pathway and a PI3-K-independent pathway (reviewed in [1]).

In muscle and adipose tissue, the PI3-K-dependent pathway is induced when activation of the insulin receptor by insulin results in tyrosine phosphorylation of several substrates, including the insulin receptor substrate 1 (IRS-1), IRS-2 and *IRS-3* (in the adipose tissue) (reviewed in [2]). Following tyrosine phosphorylation, IRSs bind and activate the PI3-K enzyme. Once activated, PI3-K mediates the increase in serine phosphorylation of protein kinase B (Akt), which, in turn, stimulates glucose transport and lipogenesis (reviewed in [1,2]).

Recently, the proto-oncogene, Casitas b-lineage lymphoma (Cbl), has been suggested to play a role in insulin action, independently of the PI-3K/Akt pathway [3]. In 3T3-L1 adipo-

\*Corresponding author. Fax: +55 19 3788 8950.

E-mail address: msaad@fcm.unicamp.br (M.J.A. Saad).

cytes, Cbl forms a complex with 2 adaptor proteins, adapter protein with Pleckstrin homology and Src homology 2 domains (APS) and Cbl associated protein (CAP). Upon insulin stimulation, this complex binds to the insulin receptor via an interaction between an SH2 domain in APS and the tyrosylphosphorylated receptor tail [4]. Cbl then undergoes insulin-dependent tyrosine phosphorylation, resulting in the recruitment of the CAP/Cbl complex to lipid rafts via an interaction between the CAP and the lipid raft protein flotillin [5]. Within the lipid raft, tyrosyl-phosphorylated Cbl recruits the CrkII/C3G heterodimer via an interaction between an SH2 domain in CrkII and a tyrosine phosphorylation site in Cbl [6]. C3G, a guanine nucleotide exchange factor for small molecular weight GTPases, activates the small G protein TC10. The activation of TC10 provides a second signal to the glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and may function in parallel with the activation of the PI3-K pathway [6].

In a previous study, we employed 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C] glucose (2DG) uptake analysis to show that a high-fat diet induces a tissue-specific regulation of glucose transport with reduced glucose uptake and insulin signaling in muscle that is accompanied by an increased insulin-stimulated glucose uptake in adipose tissue, while the early steps of insulin signaling are not increased [7]. These results suggest that the molecular mechanism that accounts for this increase in glucose transport in fat is independent of the PI3-K/Akt pathway, since there is no modulation of this pathway in the adipose tissue of high-fat diet (HFD) rats.

Thus, in the present study, we investigated the modulation of the CAP/Cbl pathway in the muscle and adipose tissue of HFD, and also evaluated if this pathway may account for increased glucose uptake in adipocytes of these animals.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Materials

Male Wistar rats were provided by the State University of Campinas – Central Breeding Center (Campinas, SP, Brazil). Anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -PY), anti-IR $\beta$  ( $\alpha$ -IR), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-IRS-3, anti-c-Cbl ( $\alpha$ -Cbl), anti-CAP ( $\alpha$ -CAP), anti-Akt1/2, anti-phospho-C3G and anti-GLUT4 antibodies were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho-Akt antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN, USA). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless specified elsewhere. <sup>125</sup>I-Protein A and 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C] glucose were obtained from Amersham (Amersham Pharmacia Biotech-United Kingdom-Ltd. Buckinghamshire, UK).

*Abbreviations:* HFD, high-fat diet; WAT, white adipose tissue; 2DG, 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C] glucose; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, protein kinase B; Cbl, casitas b-lineage lymphoma; CAP, Cbl-associated protein; GL-UT4, glucose transporter 4

#### 2.2. Animals

All experiments were approved by the Ethics Committee at the State University of Campinas.

Eight-week-old male Wistar rats were divided into two groups with similar body weights  $(250 \pm 5 \text{ g})$  and assigned to receive water ad libitum and two kinds of diet: a standard rodent chow (C) (carbo-hydrate: 70%; protein: 20%; fat: 10%, totaling 3.8 kcal/g) or a HFD (carbohydrate: 38.5%; protein: 15%; fat: 46.5%, totaling 5.4 kcal/g) for 30 days.

#### 2.3. Animal characterization

At the end of the diet period, the body weight and epididymal fat pad were measured. Food was withdrawn 12 h before the experiments and blood samples were taken for the determination of the serum concentration of insulin and glucose levels. Blood glucose levels were measured by the glucose oxidase method [8]. Serum insulin was determined by radioimmunoassay.

#### 2.4. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedures

After 12 h of fasting, animals were anesthetized intraperitoneally with a mix of ketamin (100 mg) and diazepam (0.07 mg) (0.2 ml/ 100 g body weight) and catheters were then inserted into the left jugular vein (for tracer infusions) and carotid artery (for blood sampling), as previously described [9]. Experiments were started when glycemia had returned to stable levels, 30 min after the end of the surgical procedure. A 120-min hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedure was conducted in anesthetized catheterized rats, as shown previously [7,9], with a prime continuous infusion of human insulin at a rate of 3.6 mU/kg body wt/min to raise the plasma insulin concentration to approximately 800-900 pmol/l. Blood samples (20 µl) were collected at 5-min intervals for the immediate measurement of plasma glucose concentration, and 10% unlabeled glucose was infused at variable rates to maintain plasma glucose at fasting levels. To estimate insulin-stimulated glucose-transport activity and metabolism in skeletal muscle and adipose tissue, 2-deoxy-D-[1-14C] glucose was administrated as a bolus (10 µCi) 45 min before the end of the clamp procedure. All infusions were performed using Harvard infusion pumps. At the end of the clamp procedure, animals were killed by a mix of ketamin and diazepam intravenous injection. Within 2 min, two skeletal muscles (soleus and gastrocnemius) from both hind limbs and epididymal white adipose tissue were taken. Each tissue, once exposed, was dissected out within 2 s, weighed, frozen with liquid  $N_2$  and stored at -80 °C for later analysis.

#### 2.5. Analytical procedures of hyperinsulinemic-euglycemic clamp

Plasma glucose was measured using a glucometer (Advantage, Boehringer Mannheim, USA). The whole blood glucose uptake was obtained from averaged rates of the last 30 min of 10% unlabeled glucose infusion during clamp procedures. Glucose transport activity in skeletal muscle and in adipose tissue was calculated from the tissue 2DG profile, as described before [7,10].

#### 2.6. Tissue extraction and immunoprecipitation

Rats were anesthetized with a mix of ketamin (100 mg) and diazepam (0.07 mg) (0.2 ml/100 g body weight) and used 10–15 min later. As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed and 0.2 ml of normal saline with or without  $10^{-6}$  M insulin was injected. 90 s and 5 min after the insulin injection, the skeletal muscle and the adipose tissue were removed, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer, as described elsewhere [7]. Extracts were then centrifuged at 11000 rpm and 4 °C for 40 min to remove insoluble material and the supernatants were used for immunoprecipitation with  $\alpha$ -IR,  $\alpha$ -IRS-1,  $\alpha$ -IRS-2,  $\alpha$ -IRS-3,  $\alpha$ -Cbl and Protein A-Sepharose 6MB (Amersham Pharmacia Biotech-United Kingdom-Ltd Buckinghamshire, UK).

#### 2.7. Protein analysis by immunoblotting

The precipitated proteins and/or whole tissue extracts were treated with Laemmli sample buffer [11] containing 100 mM DTT and heated in a boiling water bath for 5 min, after which they were subjected to SDS–PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). For total extracts, 250  $\mu$ g proteins were subjected to SDS–

PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 120 min at 120 V in a Bio-Rad Mini-Protean transfer apparatus [12]. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter for 2 h in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween20). The nitrocellulose blot was incubated with specific antibodies overnight at 4 °C and then incubated with <sup>125</sup>I-Protein A. The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA; model GS300).

#### 2.8. Plasma membrane GLUT4 determination

To characterize the expression and subcellular localization of GLUT4, a subcellular fractionation protocol was employed as described previously [13] with minor modifications. Fragments of skeletal muscle and adipose tissue from untreated rats or rats treated with insulin (0.2 ml,  $10^{-6}$  M, tissue obtained 15 min after insulin infusion), according to the protocols described above, were minced and homogenized in 2 vol. of STE buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, and 0.1 mg aprotinin/ml] at 4 °C with a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged  $(1000 \times g, 25 \text{ min}, 4 \text{ °C})$  to obtain pellets. The pellets were washed once with STE buffer  $(1000 \times g, 10 \text{ min}, 1000 \times g, 10 \text{ min})$ 4 °C) and suspended in Triton buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 100 mM sodium pyrophosphate, and 0.1 mg aprotinin/ml), kept on ice for 30 min, and centrifuged  $(15000 \times g, 30 \text{ min}, 4 \circ \text{C})$  to obtain the nuclear fraction. The supernatant was centrifuged  $(100\,000 \times g, 60 \text{ min}, 4 \,^{\circ}\text{C})$  to obtain the cytosol fraction and the pellet, which was suspended in STE buffer 1% NP-40, kept on ice for 20 min, and centrifuged  $(100000 \times g,$ 20 min) to obtain the membrane fraction. The fractions were treated with Laemmli buffer with 100 mM DTT and heated in a boiling water bath for 5 min, and aliquots (100 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-GLUT4 antibody, as described elsewhere [14].

#### 2.9. Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. accompanied by the indicated number of independent experiments. For statistical analysis, the groups were compared using *t* test or one-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level of significance adopted was P < 0.05.

#### 3. Results

#### 3.1. Animal characteristics

Table 1 shows that the body weight (P < 0.0001), the epididymal fat (P < 0.01) and the fasting serum insulin levels (P < 0.01) were higher in HFD rats than in control rats, despite their similar fasting blood glucose levels.

## 3.2. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedures in combination with 2DG infusion

The glucose infusion rate needed to clamp glycemia at fasting levels in the presence of a constant infusion of insulin

Fable 1		
Animal	characteristics	

	Control	HFD
Body weight (g)	$286.8 \pm 7.4$	$343.2 \pm 4.1^*$
Epididymal fat (g/100 g)	$1.2 \pm 0.08$	$1.7 \pm 0.1^{**}$
Blood glucose (mg/dl)	88 ± 3	96 ± 5
Serum insulin (pmol/l)	$8.8 \pm 1.5$	$19.2 \pm 2.1^{**}$

Data are means  $\pm$  S.E.M. Each group was composed of 5–7 animals. \*HFD vs. C, P < 0.0001.

\*\*HFD vs. C, *P* < 0.01.



Fig. 1. Steady-state glucose infusion rates obtained from averaged rates of 90–120 min of 10% unlabeled glucose infusion during hyperinsulinemiceuglycemic clamp procedures in control rats (C) and in rats fed on HFD for 30 days (A). Glucose transport in skeletal muscle and in adipose tissue evaluated by 2DG uptake during the last 45 min of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies (B). Data are means  $\pm$  S.E.M. of five independent experiments.  $\dagger$  HFD vs. C, P < 0.01;  $\ast$  HFD vs. C, P < 0.001;  $\ddagger$  HFD vs. C, P < 0.001.

(3.6 mU/kg body weight/min) was lower (C:  $18.8 \pm 4$ ; HFD:  $3.5 \pm 1.1$  mg/kg/min, P < 0.01; Fig. 1A) in rats fed on the HFD than in their respective controls.

As shown in Fig. 1B, there was a significant decrease (C:  $200 \pm 15$ ; HFD:  $50 \pm 12 \eta \text{mol/g/min}$ , P < 0.0001) in glucose uptake in the muscle of HFD rats when compared with the control animals. In contrast, the adipose tissue showed a significantly higher (C:  $148 \pm 10$ ; HFD:  $250 \pm 15 \eta \text{mol/g/min}$ , P < 0.001) glucose uptake in HFD rats when compared with the control animals.

#### 3.3. Insulin signaling in the adipose tissue of controls and HFDtreated rats

There were no differences in IR protein levels nor in insulininduced IR tyrosine phosphorylation in the adipose tissue of HFD and control animals (Fig. 2A and B).

Despite similar levels of IRS-1 in the adipose tissue of animals fed on the HFD and on the control diet, there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C:  $100 \pm 1.3\%$ ; HFD:  $60 \pm 1.1\%$ , P < 0.001; Fig. 2C) and in IRS-1/PI3-K association (C:  $100 \pm 1.1\%$ ; HFD:  $64 \pm 1\%$ , P < 0.001; Fig. 2D) when compared with the control group. There were no differences in IRS-2 protein levels in the adipose tissue of HFD rats, compared with controls. Animals fed on the HFD presented insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation and association of the IRS-2/PI3-K in a similar to control animals (Fig. 2E and F). There were no differences in IRS-3 protein levels in the adipose tissue of HFD rats, compared with controls. However, animals fed on the HFD presented a decrease in insulin-stimulated IRS-3 tyrosine phosphorylation (C:  $100 \pm 6\%$ ; HFD:  $45 \pm 9.4\%$ , P < 0.001; Fig. 2G) and a decrease in IRS-3/PI3-K association (C:  $100 \pm 15\%$ ; HFD:  $42 \pm 5.2\%$ , P < 0.001; Fig. 2H) compared to control animals.

There were no differences in Akt protein levels nor in insulininduced Akt serine phosphorylation in the adipose tissue of HFD, compared to control animals (Fig. 2I).

#### 3.4. The CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of controls and HFD-treated rats

There were increases in Cbl (C:  $100 \pm 5\%$ ; HFD:  $150 \pm 3\%$ , P < 0.0001; Fig. 3A) and CAP (C:  $100 \pm 3\%$ ; HFD:

140 ± 2.5%, P < 0.0001; Fig. 3B) protein expressions in adipose tissue from HFD rats, compared to control rats. There was also an increase in insulin-stimulated c-Cbl tyrosine phosphorylation (C: 100 ± 1.1%; HFD: 200 ± 1.5%, P < 0.001; Fig. 3C) in the fat of HFD-fed rats compared with control rats. In addition, there was an increase in CAP/Cbl association (C: 100 ± 14%; HFD: 200 ± 23%, P < 0.001; Fig. 3D) in the HFD group, compared to control group. We also observed an increase in insulin-stimulated C3G tyrosine phosphorylation (C: 100 ± 0.8%; HFD: 190 ± 1.7%, P < 0.001; Fig. 3E) in the adipose tissue of HFD-fed rats compared with control rats. In subcellular fractionation studies, there was an insulin-dependent increase of GLUT4 in the membrane fraction (C: 158 ± 1.3%; HFD: 180 ± 1.1%, P < 0.05; Fig. 3F) in the adipose tissue of HFD-fed rats compared to control rats.

## 3.5. Insulin signaling and CAP/Cbl pathway in the skeletal muscle of controls and HFD-treated rats

There were no differences in IR protein levels in the muscles of HFD and control animals (Fig. 4A); however, animals fed on a HFD showed a significantly reduced insulin-stimulated IR tyrosine phosphorylation in muscle (C:  $100 \pm 1\%$ ; HFD:  $51 \pm 1.3\%$ , P < 0.001; Fig. 4B) compared with control rats.

Despite similar levels of IRS-1 in the skeletal muscle of animals fed on a HFD and those on the control diet (Fig. 4C), there was a decrease in insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation (C:  $100 \pm 5.3\%$ ; HFD:  $40 \pm 2.1\%$ , P < 0.001; Fig. 4C) and in IRS-1/PI3-K association (C:  $100 \pm 0.7\%$ : HFD:  $42 \pm 1\%$ , P < 0.001; Fig. 4D) when compared with the control group. There were no differences in IRS-2 protein levels in the skeletal muscle of HFD rats, compared with controls (Fig. 4E). In contrast, there was a significant reduction in insulin-stimulated IRS-2 tyrosine phosphorylation (C:  $100 \pm 2\%$ ; HFD: 52 ± 1.1%, P < 0.001 Fig. 4E) and in IRS-2/PI3-K association when compared with control animals (C:  $100 \pm 3.1\%$ ; HFD:  $50 \pm 4.8\%$ , P < 0.001 Fig. 4F). There were no differences in Akt protein levels (Fig. 4G). However, there was a reduction in insulin-stimulated Akt serine phosphorylation in animals fed on a HFD, when compared with controls (C:  $100 \pm 6\%$ ; HFD:  $30 \pm 2\%$ , P < 0.001 Fig. 4G).

When we performed immunoprecipitation of whole tissue extracts with anti-Cbl and immunoblotting with



Fig. 2. Insulin signaling in the adipose tissue of control animals and rats fed on a HFD for 30 days. IP with  $\alpha$ -IR and IB with  $\alpha$ -IR antibodies (A); IP with  $\alpha$ -IR and IB with  $\alpha$ -pY antibodies (B); IP with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -PY antibodies (C); IP with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -PY antibodies (C); IP with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-2 and IB with  $\alpha$ -IRS-2 and IB with  $\alpha$ -IRS-2 and IB with  $\alpha$ -PY antibodies (E); IP with  $\alpha$ -IRS-2 and IB with  $\alpha$ -IRS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IP with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IP with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IP with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-PY-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PY-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-S-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-S-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -PX-S-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 and IB with  $\alpha$ -RS-3 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-4 antibodies (H); IB with  $\alpha$ -RS-3 an



Fig. 3. CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of control animals and rats fed on a HFD for 30 days. IB with  $\alpha$ -c-Cbl antibody (A); IB with  $\alpha$ -CAP antibody (B); IP with  $\alpha$ -c-Cbl and IB with  $\alpha$ -pY antibodies (C); IP with  $\alpha$ -c-Cbl and IB with  $\alpha$ -cAP antibodies (D); IB with  $\alpha$ -pC3G antibody (E); IB with  $\alpha$ -GLUT4 antibody in the plasma membrane (F). Data are means ± S.E.M. of six independent experiments. \* HFD vs. C, P < 0.0001; # HFD<sup>-</sup> vs. C<sup>-</sup>, P < 0.001; § HFD<sup>+</sup> vs. C<sup>+</sup>, P < 0.05; †† HFD<sup>+</sup> vs. C<sup>+</sup>, P < 0.05. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting.

anti-phosphotyrosine antibody, we did not observe insulin-induced Cbl tyrosine phosphorylation. In addition, CAP protein expression and insulin-induced C3G tyrosine phosphorylation could not be detected by blotting whole tissue extracts with anti-CAP and anti-phospho-C3G antibodies (data not shown). However, when we used the plasma membrane fraction for immunoprecipitation with anti-Cbl antibody, insulin-induced Cbl tyrosine phosphorylation was detected in the skeletal muscle. In this experiment with the plasma membrane fraction, there was a decrease in insulin-stimulated c-Cbl tyrosine phosphorylation in the skeletal muscle in HFD rats compared to control rats (C:  $100 \pm 1.1\%$ ; HFD:  $60 \pm 1.5\%$ , P < 0.001; Fig. 4H). We also observed, in the subcellular fractionation studies, that there was an insulin-dependent decrease of GLUT4 in the membrane fraction (C:  $100 \pm 4\%$ ; HFD:  $88 \pm 1.9\%$ , P < 0.05; Fig. 4I) in the skeletal muscle of HFDfed rats compared to control rats.

antibody (I). Data are means  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments. \* HFD<sup>+</sup> vs. C<sup>+</sup>, P < 0.001; # HFD<sup>-</sup> vs. C<sup>-</sup>, P < 0.05. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting.



Fig. 4. Insulin signaling and CAP/Cbl pathway in the skeletal muscle of control animals and rats fed on a HFD for 30 days. IP with  $\alpha$ -IR and IB with  $\alpha$ -IR antibodies (A); IP with  $\alpha$ -IR and IB with  $\alpha$ -pY antibodies (B); IP with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -P3-IRS-1 and IB with  $\alpha$ -IRS-1 and IB with  $\alpha$ -P3-F1 and IB with  $\alpha$ -IRS-2 and IB with  $\alpha$ -P3-K antibodies (F); IP with  $\alpha$ -Akt1/2 antibody and IB with  $\alpha$ -pAkt antibody (G); IP with  $\alpha$ -c-Cbl and IB with  $\alpha$ -c-Cbl antibody and

#### 4. Discussion

High fat intake is associated with a tissue-specific insulin resistance, characterized by reduced insulin sensitivity in liver, muscle, hypothalamus, but not in adipose tissue, at least during the first month of a high-fat diet [7]. Moreover, the white adipose tissue (WAT) of HFD-rats is more sensitive to insulin action during euglycemic hyperinsulinemic clamp conditions, where glucose utilization is dramatically increased [7]. The molecular mechanism that may account for this increase in glucose uptake in WAT, despite the existence of skeletal muscle and whole body insulin resistance, is not well established. In this study, we associated functional studies of insulin sensitivity with immunoblotting, to investigate which pathways are involved in this tissue-specific regulation of glucose transport in the adipose tissue and in skeletal muscle of high-fat-diet rats.

Our data show that, in the adipose tissue of HFD-animals, there is an increase in CAP and Cbl protein expression, and a further increase in insulin-induced Cbl tyrosine phosphorylation, in CAP/Cbl association and in C3G tyrosine phosphorylation, indicating an increased activity of this pathway. Since this pathway may have an important role in glucose uptake in adipocytes [15,16], we may suggest that its increased activity, in parallel to an increase in insulin-induce GLUT4 in the membrane fraction in adipose tissue of HFD-fed rats compared to controls, may explain the increased glucose utilization during the euglycemic hyperinsulinemic clamp, and also the increased adiposity of HFD-rats. In accordance with these data, recent reports show that, in c-Cbl or CAP knockout mice on a high-fat diet there is a smaller increase in adiposity than in wild-type mice [17,18].

The increase in glucose uptake in adipose tissue contrasts with the ability of insulin to stimulate the IRS-1 and IRS-3 tyrosine phosphorylation. In a previous study in human adipocytes from type 2 diabetic patients, a remarkable reduction in IRS-1 protein expression and tyrosine phosphorylation was demonstrated. In this case, IRS-2 was able to replace IRS-1 as the main docking protein for binding and activation of PI3-K [19]. In accordance, our results showed no alteration in insulin-induced IRS-2 tyrosine phosphorylation and the association with PI3-K. Since Akt, the downstream effector of the IRSs/PI3-K pathway showed a similar insulin-induced serine phosphorylation in the adipose tissue of HFD animals, we may suggest that IRS-2 may replace the reduction in IRS-1 and IRS-3 tyrosine phosphorylation in these animals.

The reduction in insulin signaling, through IRS-1 and IRS-3, and the absence of any alteration in the IRS-2/Akt pathway contrasts with the ability of insulin to stimulate the CAP/ Cbl/C3G pathway in the adipose tissue of high fat diet-fed rats. In this regard, it is important to emphasize that, in the adipose tissue of HFD rats, no alteration was observed in insulin-induced insulin receptor phosphorylation. Moreover, the expressions of CAP and Cbl were higher in the adipose tissue of these rats, probably contributing to the increase in the insulin-induced activation of this pathway. A reduction in

IP with  $\alpha$ -c-Cbl and IB with  $\alpha$ -pY antibody in the plasma membrane (H); IB with  $\alpha$ -GLUT4 antibody in the plasma membrane (I). Data are means  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments. \* HFD<sup>+</sup> vs. C<sup>+</sup>, P < 0.001, † HFD<sup>+</sup> vs. C<sup>+</sup>, P < 0.05. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting.

insulin-induced CAP/Cbl pathway activation was recently reported in adipose and cardiac tissues from ob/ob mice [20]; however, in these mice, there was a significant reduction in the level of insulin receptor tyrosine phosphorylation in both tissues. This reduction is likely to account for the lower Cbl phosphorylation seen in ob/ob following insulin administration.

In a previous study, we showed that plasma insulin levels are paralleled by Cbl protein expression, tyrosine phosphorylation and association with CAP [21]. The result of the present study reinforces these data showing that, in HFD-rats, an hyperinsulinemic animal model of insulin resistance, there is an increase in the activity of the CAP/Cbl/C3G pathway in adipose tissue.

The reduced glucose uptake in muscle of HFD was accompanied by a decrease in insulin-induced IR/IRSs/PI-3K/Akt pathway. The reduced activity of this pathway has biological importance because it is related to glucose transport in muscle. In accordance, our data also demonstrated an insulin-dependent decrease of GLUT4 in the plasma membrane fraction in the skeletal muscle of HFD-fed rats compared to control rats.

In a previous paper [21] and in the present study we did not detect insulin-induced Cbl tyrosine phosphorylation in immunoprecipitates of whole tissue extracts of skeletal muscle. On the other side, in accordance with Bernard et al. [22] we showed insulin-induced Cbl tyrosine phosphorylation in plasma membrane immunoprecipitates of skeletal muscle of rats, and a reduction in this protein phosphorylation level in the muscle of HFD rats. However, we did not observe insulin-induced C3G tyrosine phosphorylation in this tissue in controls nor in HFD rats. Cbl activation has been previously demonstrated in perfused hindlimb muscle, but downstream signaling such C3G tyrosine phosphorylation or TC10 activation were not examined [22]. Gupte and Mora recently demonstrated that TC10 is not activated in skeletal muscle, despite the tyrosine phosphorylation of Cbl in response to insulin [20]. In accordance with this, glucose transport is not reduced in isolated skeletal muscle from c-Cbl knockout mice [23], suggesting that the Cbl/CAP/C3G/TC10 pathway may not have an important role in regulating glucose uptake in this tissue.

In conclusion, we may suggest that, in HFD, the differential regulation of insulin-induced glucose uptake between skeletal muscle and adipose tissue may in part be the consequence of the CAP/Cbl/C3G pathway, since the expression of CAP and Cbl, and also the activation of this pathway, were increased in adipose tissue but not in muscle.

Acknowledgements: The authors thank Mr. Luis Janieri, Mr. Márcio Alves da Cruz and Mr. Jósimo Pinheiro for their technical assistance. This work was supported by Grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

#### References

- [1] Saltiel, A.R. and Pessin, J.E. (2002) Insulin signaling pathway in time and space. Trends Cell Biol. 12, 65–71.
- [2] Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. and Kahn, C.R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Mol. Cell Biol. 7, 85–95.
- [3] Saltiel, A.R. and Pessin, J.E. (2003) Insulin signaling in microdomais of the plasma membrane. Traffic 4, 711–716.
- [4] Liu, J., Kimura, A., Baumann, C.A. and Saltiel, A.R. (2002) APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Cell Biol. 22, 3599–3609.

- [5] Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2000) CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. Nature 407, 202–207.
- [6] Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires CAP-dependent activation of TC10. Nature 410, 944– 948.
- [7] Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Amaral, M.E.C., Höer, N.F., Boschero, A.C. and Saad, M.J.A. (2005) Western diet modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology 146, 1576–1587.
- [8] Trinder, P. (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. J. Clin. Pathol. 22, 158–161.
- [9] Prada, P., Okamoto, M.M., Furukawa, L.N., Machado, U.F., Heimann, J.C. and Dolnikoff, M.S. (2000) High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. Hypertension 35, 424–429.
- [10] Ferre, P., Leturque, A., Burnol, A.F., Penicaud, L. and Girard, J. (1985) A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anaesthetized rat. Biochem. J. 228, 103–110.
- [11] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- [12] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350–4354.
- [13] Mizukami, Y. and Yoshida, K. (1997) Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. Biochem. J. 323, 785–790.
- [14] Gasparetti, A.L., de Souza, C.T., Pereira-da-Silva, M., Oliveira, R.L., Saad, M.J., Carneiro, E.M. and Velloso, L.A. (2003) Cold exposure induces tissuespecific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. J. Physiol. 552, 149–162.
- [15] Ribon, V. and Saltiel, A.R. (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. Biochem. J. 324, 839–845.
- [16] Ribon, V., Printen, J.A., Hoffman, N.G., Kay, B.K. and Saltiel, A.R. (1998) A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Cell Biol. 18, 872–879.
- [17] Molero, J.C., Waring, S.G., Cooper, A., Turner, N., Laybutt, R., Cooney, G.J. and James, D.E. (2006) Casitas b-lineage lymphoma-deficient mice are protected against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 55, 708–715.
- [18] Lesniewski, L.A., Folian, B.J. and Olefsky, J.M. (2005) CAP delection protects against high fat diet-induced insulin resistance. Diabetes 54, (Abstract 23).
- [19] Rondinone, C.M., Wang, L.M., Lonnroth, P., Wesslau, C., Pierce, J.H. and Smith, U. (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4171–4175.
- [20] Gupte, A. and Mora, S. (2006) Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342, 751–757.
- [21] Thirone, A.C., Carvalheira, J.B., Hirata, A.E., Velloso, L.A. and Saad, M.J. (2004) Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. Endocrinology 145, 281–293.
- [22] Bernard, J.R., Reeder, D.W., Herr, H.J., Rivas, D.A. and Yaspelkis III, B.B. (2006) High-fat feeding effects on components of the CAP/Cbl signaling cascade in Sprague-Dawley rat skeletal muscle. Metabolism 55, 203–212.
- [23] Molero, J.C., Jensen, T.E., Withers, P.C., Couzens, M., herzog, H., Thien, C.B.F., Langdon, W.Y., Walder, K., Murphy, M.A., Bowtell, D.D.L., James, D.E. and Cooney, G.J. (2004) C-Cbldeficient mice have reduced adiposity, higher energy expenditure, and improved peripheral insulin action. J. Clin. Invest. 114, 1326– 1333.



## Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation

Eduardo R. Ropelle, José R. Pauli, Patrícia O. Prada, Cláudio T. de Souza, Paty K. Picardi, Marcel C. Faria, Dennys E. Cintra, Maria Fernanda de A. Fernandes, Marcelo B. Flores, Lício A. Velloso, Mario J. A. Saad and José B. C. Carvalheira

J. Physiol. 2006;577;997-1007; originally published online Sep 28, 2006;

DOI: 10.1113/jphysiol.2006.120006

### This information is current as of March 20, 2007

This is the final published version of this article; it is available at: http://jp.physoc.org/cgi/content/full/577/3/997

This version of the article may not be posted on a public website for 12 months after publication unless article is open access.

*The Journal of Physiology Online* is the official journal of The Physiological Society. It has been published continuously since 1878. To subscribe to *The Journal of Physiology Online* go to: http://jp.physoc.org/subscriptions/. *The Journal of Physiology Online* articles are free 12 months after publication. No part of this article may be reproduced without the permission of Blackwell Publishing: JournalsRights@oxon.blackwellpublishing.com

## Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation

Eduardo R. Ropelle, José R. Pauli, Patrícia O. Prada, Cláudio T. de Souza, Paty K. Picardi, Marcel C. Faria, Dennys E. Cintra, Maria Fernanda de A. Fernandes, Marcelo B. Flores, Lício A. Velloso, Mario J. A. Saad and José B. C. Carvalheira

Department of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), 13081-970-Campinas, São Paulo, Brazil

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. Diet-induced obesity (DIO) increased the expression and activity of the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and attenuated insulin signalling in gastrocnemius muscle of rats, a phenomenon which was reversed by a single session of exercise. In addition, DIO was observed to lead to serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), which was also reversed by exercise in muscle in parallel with a reduction in c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity. Thus, acute exercise increased the insulin sensitivity during high-fat feeding in obese rats. Overall, these results provide new insights into the mechanism by which exercise restores insulin sensitivity.

(Resubmitted 25 August 2006; accepted 25 September 2006; first published online 28 September 2006) **Corresponding author** J. B. C. Carvalheira: Departamento de Clínica, Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, Brazil, 13081-970. Email: carvalheirajbc@uol.com.br

Insulin resistance of skeletal muscle glucose transport is a key defect in the development of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. It is well established that chronic exercise can have beneficial effects on insulin action in insulin-resistant states (Henriksen, 2002). It is important to note that improvements in glucose tolerance can be observed in people with mild type 2 diabetes mellitus after acute exercise (Azevedo *et al.* 1995; Kennedy *et al.* 1999). The molecular mechanism for enhanced glucose uptake with chronic exercise may be partly related to increased expression and activity of key proteins known to regulate glucose metabolism in skeletal muscle (Hjeltnes *et al.* 1998; Chibalin *et al.* 2000; Zierath, 2002).

The action of insulin is mediated by receptor binding at the surface of insulin-sensitive tissue (Czech & Corvera, 1999). The insulin receptor (IR) is a protein with endogenous tyrosine kinase activity that, following activation by insulin, undergoes rapid autophophorylates phophorylation and subsequently intracelular protein substrates, such as insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) (Cheatham & Kahn, 1995). Phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 tyrosine residues induces activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) by binding the p85 subunit and activating the catalytic p110 subunit (White & Kahn, 1994). Activation of a serine/threonine kinase Akt occurs downstream from PI3-K. Once phosphorylated, Akt contributes to various biological processes including regulation of glucose uptake (Virkamaki *et al.* 1999).

Dephosphorylation of IR and IRS-1 or serine phosphorylation of IR substrates are the main mechanisms that suppress the insulin pathway (Ventre et al. 1997; Greene et al. 2003). Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are important regulators of tyrosine phosphorylation-dependent signalling events and may represent novel targets for therapeutic intervention in a variety of human diseases (Tonks, 2003). Several PTPs, including PTP $\alpha$ , PTP $\varepsilon$ , CD45, SHP2, LAR and PTP1B, have been implicated as negative regulators of insulin signalling (Asante-Appiah & Kennedy, 2003). PTP1B is a major PTP implicated in the regulation of insulin action, including in the insulin-resistant state (Seely et al. 1996; Elchebly et al. 1999). c-Jun N-terminal kinase (JNK) is a member of the mitogen-activated protein (MAP) kinase family (Weston et al. 2002) and can be activated by tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Hirosumi *et al.* 2002) and interleukin  $1\beta$  (IL  $1\beta$ ) (Major & Wolf, 2001). In addition, JNK might serve as a feedback inhibitor during insulin stimulation (Lee et al. 2003). Three JNK isoforms have been described, JNK1, 2 and 3 (Jp & Davis, 1998), of which JNK1 is most involved in the pathophysiology of obesity and insulin resistance (Hirosumi et al. 2002).

 $<sup>{\</sup>ensuremath{\mathbb C}}$  2006 The Authors. Journal compilation  ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2006 The Physiological Society

	Standard	High-fat
Ingredients	chow (g)	diet (g)
Casein	202	200
Sucrose	100	100
Cornstarch	397	115.5
Dextrinated starch	130.5	132
Lard	—	312
Soybean oil	70	40
Cellulose	50	50
Mineral mix American		
Institute of Nutrition (AIN)-93	35	35
Vitamin mix AIN-93	10	10
L-cystine	3	3
Choline	2.5	2.5

JNK activation induces inhibitory serine 307 (Ser307) phosphorylation of IRS-1, (Aguirre *et al.* 2000; Lee *et al.* 2003). Ser307 is located next to the PTB domain in IRS-1 and its phosphorylation inhibits the interaction of the PTB domain with the phosphorylated NPEY motif in the activated insulin receptor, causing insulin resistance (Aguirre *et al.* 2002). Previous studies suggest that, in addition to JNK, I $\kappa$ B kinase beta (IKK $\beta$ ) phoshorylation also increases serine phosphorylation of IRS-1. Thus, the IKK complex appears to be another candidate that plays a key role in the phosphorylation of IRS-1 and in the regulation of insulin sensitivity.

As much of the molecular basis underlying the beneficial effects of exercise in the insulin-resistant state remains unclear, the current study was designed to investigate the effects of a single bout of exercise on PTP1B activity and IRS-1 serine phosphorylation associated with insulin resistance induced by DIO.

#### Methods

#### Experimental animals and diet

Male Wistar rats from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

The 4-week-old Wistar rats were divided into three groups, control rats fed standard rodent chow (Table 1), obese rats fed on an obesity-inducing diet for 3 months (DIO) (Table 1) and DIO rats submitted to a single bout of exercise (DIO + EXE).

#### **Exercise protocol**

Rats were acclimated to 10 min swimming for 2 days. The animals swam for two 3 h bouts separated by a 45 min rest period and the water temperature was maintained at  $\sim$ 34°C. This exercise protocol was adaptated from a

published procedure (Chibalin *et al.* 2000). After the last bout of exercise, animals were fed *ad libitum* and food was withdrawn 6 h before the tissue extraction. The rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium thiopental (40 mg (kg body weight)<sup>-1</sup>) 8 and 16 h after the exercise protocol. Following the experimental procedures, the rats were killed under anaesthesia (200 mg kg<sup>-1</sup> thiopental) following the recommendations of the NIH.

## Insulin tolerance test, serum insulin quantification and glycogen formation

The rats were given an insulin tolerance test (ITT; 1.5 IU insulin (kg body weight)<sup>-1</sup>) 16 h after the exercise protocol. Briefly, 1.5 IU kg<sup>-1</sup> human recombinant insulin (Humulin R) from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) was infused intraperitoneally to anaesthetized rats, the blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min from the tail for serum glucose determination. The rate constant for plasma glucose disappearance  $(K_{itt})$  was calculated using the formula 0.693/biological half life  $(t_{\psi})$ . The plasma glucose  $(t_{\psi})$ was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose concentration during the linear phase of decline (Bonora et al. 1989). Plasma glucose level was determined using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, USA). Plasma was separated by centrifugation (1100 g) for 15 min at  $4^{\circ}$ C and stored at -80°C until assayed. Radioimmunoassay was employed to measure serum insulin level, according to a previous description (Scott et al. 1981). Glycogen content in gastrocnemius muscle fragments was measured, according to a previously described method (Pimenta et al. 1989).

#### Hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp procedures

HPLC-purified 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]glucose (2-[<sup>14</sup>C]DG) was obtained from Amersham Biosciences Group (UK). The Harvard apparatus (model 11) and Harvard compact infusion pumps (model 975) were obtained from South Natick, MA, USA.

After 6 h of fasting, animals were anaesthetized intraperitoneally and catheters were then inserted into the left jugular vein (for tracer infusions) and carotid artery (for blood sampling), as previously described (Prada *et al.* 2000). Experiments were started when glycaemia had returned to stable levels, 30 min after the end of the surgical procedure. A 120 min hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp procedure was conducted in anaesthetized catheterized rats, as shown previously (Prada *et al.* 2000, 2005), with continuous infusion of human insulin at a rate of 3.6 mU (kg body wt)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> to raise the plasma insulin concentration to approximately 800–900 pmol 1<sup>-1</sup>. Blood samples (20  $\mu$ l) were collected at 5 min intervals for the immediate measurement of plasma glucose J Physiol 577.3

concentrations, and 10% unlabelled glucose was infused at variable rates to maintain plasma glucose at fasting levels. To estimate insulin-stimulated glucose transport and metabolism in skeletal muscle,  $(2-[^{14}C]DG)$  was administered as a bolus  $(10 \ \mu Ci)$  45 min before the end of the clamp procedure. All infusions were performed using Harvard infusion pumps. At the end of the clamp procedure, animals were killed by an intravenous injection of ketamin and diazepam. Within 2 min, both portions of gastrocnemius from hindlimbs were removed. Each tissue, once exposed, was dissected out within 2 s, weighed, frozen with liquid N<sub>2</sub> and stored at  $-80^{\circ}C$  for later analysis.

#### Analytical procedures for hyperinsulinemiceuglycemic clamping

Plasma glucose was measured using a glucometer (Advantage, Boehringer Mannheim, USA). The whole blood glucose uptake was obtained from averaged rates of the last 30 min of 10% unlabelled glucose infusion during clamp procedures. Glucose transport activity in skeletal muscle was calculated from the tissue 2-deoxy-D-glucose (2DG) profile, as described before (Ferre *et al.* 1985; McGuinness & Mari, 1997; Prada *et al.* 2005).

#### Protein analysis by immunoblotting

As soon as anaesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the cava vein exposed, and 0.2 ml normal saline or insulin  $(10^{-9} \text{ M})$ injected. At 90 s after insulin injection, both portions of gastrocnemius were ablated, pooled, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer containing (mм): Tris 100 (pH 7.4), sodium pyrophosphate 100, sodium fluoride 100, EDTA 10, sodium vanadate 10 and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 2, and 0.1 mg aprotinin ml<sup>-1</sup> and 1% Triton-X 100 at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 15 000 r.p.m. (9000 g) and  $4^{\circ}$ C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA, USA) for 45 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification using the Bradford method (Bradford, 1976).

Proteins were denaturated by boiling in Laemmli (Laemmli, 1970) sample buffer containing 100 mM DTT, run on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked, probed and developed as previously described (Saad *et al.* 1997). The  $\beta$  subunit of the IR (IR $\beta$ ), IRS-1 and IRS-2 were immunoprecipitated from rat muscle with or without previous insulin infusion. Antibodies used for immunoblotting were anti-phosphotyrosine, anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PTP1B, anti-PI3-K, antiphosphoserine-IRS-1307

(Upstate Biotechnology, NY, USA), antiphospho-Akt (Cell Signalling Technology, MA, USA), anti-Akt, anti-JNK, antiphospho-JNK, antiphospho-c-jun, anti-I $\kappa$ B $\alpha$  and anti-SOCS3 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Blots were exposed to preflashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at  $-80^{\circ}$ C for 12–48 h. Band intensities were quantified by optical desitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD, USA) of the developed autoradiographs.

#### Protein tyrosine phosphatase activity assay

The gastrocnemius muscles were removed and homogenized in the solubilization buffer containing (mM): Tris 20 (pH 7.6), EDTA 5, PMSF 2, EGTA 1 and NaCl 130, and 0.1 mg aprotinin ml<sup>-1</sup> and 1% Triton X-100. The lysates were centrifuged (15000 g for 25 min at 4°C) and the supernatants were collected for immunoprecipitation, as previously described. Immunoprecipitates were washed in PTP assay buffer containing (mм): Hepes 100 (pH 7.6), EDTA 2, DTT 1 and NaCl 150, and  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  bovine serum albumin. The pp60<sup>c-src</sup> C-terminal phosphoregulatory peptide (TSTEPQpYQPGENL; Biomol) was added to a final concentration of 200  $\mu$ M in a total reaction volume of 60  $\mu$ l in a PTP assay buffer for the immunoprecipitation. The reaction was then allowed to proceed for 1 h at 30°C. At the end of the reaction,  $40 \,\mu$ l aliquots were placed into a 96-well plate,  $100 \,\mu l$  Biomol Green reagent (Biomol) was added, and absorbance was measured at 630 nm (Taghibiglou et al. 2002).

#### **Statistical analysis**

Where appropriate, the results were expressed as the means  $\pm$  s.E.M. Differences between the control group and DIO and between DIO and DIO + EXE were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a Bonferroni *post hoc* test was performed.

#### Results

#### Physiological and metabolic parameters

Table 2 shows comparative data regarding control, DIO and DIO + EXE rats. Rats fed on the high-fat diet for 12 weeks had a greater body weight, epididymal fat and fasting serum insulin than age-matched controls. No significant variations were found in body weight, epididymal fat and fasting serum insulin in DIO + EXE compared to DIO rats. The fasting glucose concentration was similar between the groups; however, the decrease in the glucose disappearance rate ( $K_{itt}$ ), induced by the

<sup>© 2006</sup> The Authors. Journal compilation © 2006 The Physiological Society
Groups	Number of rats ( <i>n</i> )	Body weight (g)	Epididimal fat (g)	Fasting insulin (ng ml <sup>-1</sup> )	Plasma glucose (mg dl <sup>-1</sup> )	K <sub>itt</sub> (% min <sup>-1</sup> )
Control	6	$403.4\pm21.0$	$\textbf{5.95} \pm \textbf{0.97}$	$\textbf{3.28} \pm \textbf{0.15}$	$\textbf{73.7} \pm \textbf{6.9}$	$\textbf{3.79} \pm \textbf{0.2}$
DIO	8	$544.7 \pm 32.1^{*}$	$11.85 \pm 1.47^{**}$	$\textbf{7.97} \pm \textbf{0.88}^{*}$	$84.4 \pm 7.3$	$\textbf{1.90} \pm \textbf{0.4}^{**}$
DIO + EXE	8	$546.2\pm25.2^*$	$12.1 \pm 1.34^{**}$	$\textbf{6.39} \pm \textbf{1.9}^{*}$	$\textbf{82.1} \pm \textbf{10.0}$	$\textbf{4.69} \pm \textbf{0.6\#}$

Table 2. Characteristics of Wistar rats after 3 months on a high-fat diet (DIO), DIO rats submitted to acute exercise (DIO + EXE) and their age-matched controls

\*P < 0.01, \*\*P < 0.001 versus control group and #P < 0.001 versus DIO.

high-fat diet, returned to the basal levels 16 h after acute exercise.

#### A hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp procedure with tracer infusions was performed to examine the effects of acute exercise on the metabolism of glucose in skeletal muscle. The glucose infusion rate needed to clamp glycaemia at fasting levels in the presence of a constant infusion of insulin $(3.6 \text{ mU} (\text{kg body weight})^{-1} \text{ min}^{-1})$ was 4-fold lower in DIO rats than in controls and returned to control levels in DIO + EXE rats (Fig. 1*A*).

Using 2DG uptake analysis, the insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle was quantified. As shown in Fig. 1*B*, DIO rats presented a significant reduction in glucose uptake in the skeletal muscle when compared to control group. In contrast, 16 h after the exercise protocol, insulin induced an increased glucose uptake of 33.8% in the muscle of DIO + EXE rats when compared to DIO rats. In addition, we evaluated the relative quantities of muscular glycogen in controls, DIO and DIO + EXE rats. The high-fat diet decreased glycogen levels in the gastrocnemius of DIO rats when compared to the control group, and returned to control levels 16 h after a single bout of exercise (Fig. 1*C*).

### A single bout of exercise improves insulin signalling in the muscle of DIO rats

The effect of *in vivo* intravenous insulin infusion on IR tyrosine phosphorylation was examined in the gastrocnemius muscle of control, DIO and DIO + EXE rats. The muscles were immunoprecipitated with anti-IR antibody and then blotted with anti-phosphotyrosine antibody. Insulin induced an increase in IR tyrosine phosphorylation levels in muscle from control, DIO and DIO + EXE rats. In the control animals, insulin increased IR tyrosine phosphorylation by 9.6-fold, compared with 3.1-fold increases in the muscle of DIO rats, representing reductions in IR tyrosine phosphorylation of 4.0-fold. Insulin increased IR tyrosine phosphorylation by 6.6-fold in the muscle from DIO + EXE rats, representing an increase in IR tyrosine phosphorylation of 2.6-fold compared with DIO rats (Fig. 2A upper panel). There was no difference in basal levels of IR tyrosine phosphorylation between the three groups (data not shown). The protein expression of IR in the gastrocnemius muscle of control, DIO and DIO + EXE rats was quantified by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-IR antibody.



Figure 1. Effects of acute exercise on glucose uptake and glycogen content in control, DIO and  $\mbox{DIO}+\mbox{EXE}$  rats

*A*, steady-state glucose infusion rates obtained from averaged rates of 90–120 min of 10% unlabelled glucose infusion during hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp procedures in the control, DIO and DIO rats submitted to acute exercise. *B*, glucose transport in gastrocnemius muscle was evaluated by 2-deoxy-D-glucose uptake during the last 45 min of the hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp studies. *C*, muscular glycogen content is expressed as mg (100 g tissue)<sup>-1</sup>. Bars represent means  $\pm$  s.E.M. of *n* = 5 rats. \**P* < 0.05, *versus* DIO rats.

© 2006 The Authors. Journal compilation © 2006 The Physiological Society

The IR protein levels were not different between the groups (Fig. 2*A* lower panel).

IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1-PI-3 kinase association increased in control animals by 10.6- and 10.1-fold following insulin administration, respectively, compared with 2.5- and 2.6-fold increases in the muscle of DIO rats (representing reductions in IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1-PI3K association of 6.4- and 5.6-fold, respectively), and increases of 4.7- and 5.0-fold in the muscle of DIO + EXE rats (representing increases in IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1-PI3K association of 2.4- and 2.5-fold, respectively, compared with DIO rats) (Fig. 2B upper and middle panel). IRS-2 tyrosine phosphorylation and IRS-2-PI-3 kinase association increased in control animals by 9.2- and 8.5-fold following insulin administration, respectively, compared with 2.6- and 3.0-fold increases in the muscle of DIO rats (representing reductions in IRS-2 tyrosine phosphorylation and in IRS-2-PI3K association of 5.1and 3.7-fold, respectively), and increased 5.1- and 5.9-fold in the muscle of DIO + EXE rats (representing increases in IRS-2 tyrosine phosphorylation and in IRS-2-PI3K association of 2.5 and 2.4-fold, respectively, compared with DIO rats) (Fig. 2*C* upper and middle panel). There were no differences in basal levels of IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation between the three groups (data not shown). The protein expression of IRS-1 and IRS-2 in the gastrocnemius muscle from control, DIO and DIO + EXE rats were quantified by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-IRS-1 or anti-IRS-2 antibodies. The IRS-1 and IRS-2 protein levels were not different between the groups (Fig. 2B and C lower panels). Finally, in gastrocnemius muscle from control rats, insulin increased Akt serine phosphorylation by 9.3-fold, compared with 2.8-fold increase in the muscle from DIO rats (representing reductions in Akt serine phosphorylation of 4.6-fold) and increases of 5.8-fold in the muscle of DIO + EXE rats (representing an increase in Akt serine phosphorylation of 2.6-fold compared with DIO rats) (Fig. 2D upper panel). There were no differences between the basal levels of Akt serine phosphorylation in the three groups (data not shown). The protein expression of Akt in the gastrocnemius muscle of control, DIO and DIO + EXE rats was quantified by immunoblotting with anti-Akt antibodies. The Akt protein levels were not different between the groups (Fig. 2D lower panel).





Muscle extracts from rats injected with saline or insulin were prepared as described in the Methods. A, tissue extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-IR $\beta$  antibody and immunoblotting (IB) with anti-PY antibody (upper panel) or anti-IR $\beta$  antibody (lower panel). B and C, tissue extracts were also IP with anti-IRS-1 and anti-IRS-2 antibodies and IB with anti-PY antibody (upper panels), anti-PI3K antibodies (middle panels) or anti-IRS-1, anti-IRS-2 antibody (lower panel). D, muscle extracts were IB with anti-phospho Akt and anti-Akt antibody (upper and lower panel, respectively). The results of scanning densitometry were expressed as arbitrary units. Bars represent means  $\pm$  s.E.M. of n = 6-8 rats. \*P < 0.05, versus DIO rats.

© 2006 The Authors. Journal compilation © 2006 The Physiological Society

### Acute exercise-mediated suppression of PTP1B activity in DIO rats

Obesity induced by diet increased the expression of PTP1B in DIO rats by 2.0-fold compared to control rats, a phenomenon that was reversed by acute exercise (Fig. 3*A*). Figure 3*B* shows that PTP1B activity increased in the muscle of DIO rats by 95% when compared to controls and acute exercise decreased PTP1B by 61% compared to DIO rats. To further explore the possibility that acute exercise mediated suppression of PTP1B activity in DIO rats, we observed that insulin induced IR tyrosine phosphorylation and IR/PTP1B interaction in muscle from DIO + EXE rats. The high-fat diet increased the IR/PTP1B association by 10.6-fold in the gastrocnemius muscle of DIO rats when compared with control rats and, in the muscle of DIO + EXE rats, IR/PTP1B association was decreased by 2.1-fold when compared with DIO rats (Fig. 3*C* upper panel). The IR protein levels were not different between the groups (Fig. 3*C* lower panel). As shown in Fig. 3*D*, insulin, in a time-dependent manner, induced increases in IR tyrosine phosphorylation in muscle from DIO rats after the exercise protocol, with a concomitant reduction of IR–PTP1B association. We also evaluated the IRS-1–PTP1B association in muscle from controls, DIO and DIO + EXE rats. The high-fat diet induced an increase in IRS-1–PTP1B association by 8.8-fold in gastrocnemius muscle of DIO rats when compared with control rats, and



Figure 3. Effect of acute exercise on PTP1B protein levels, activity and PTP1B association with IR $\beta$  and IRS-1

*A*, PTP1B protein level in DIO and DIO + EXE rats were compared with control group. *B*, PTP1B assay was performed as described in the Methods. *C*, tissue extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-IR $\beta$  followed by immunoblotting (IB) with anti-PTP1B antibody or anti-IR $\beta$  antibody (upper and lower panels). *D*, insulin-stimulated IR $\beta$  phosphorylation (•) and the IR $\beta$ -PTP1B association (□) were determined using IP with anti-IR $\beta$  and IB with anti-PY antibody and IP with anti-IR $\beta$  followed by IB with anti-PTP1B antibody. *E*, IP with anti-IRS-1 followed by IB with anti-PTP1B antibody to evaluated the IRS-1-PTP1B association (upper panel). Muscle extracts were also IP with anti-IRS-1 and IB with anti-IRS-1 antibody (lower panels). The results of scanning densitometry were expressed as arbitrary units. Bars represent means ± s.E.M. of n = 6-8 rats. \*P < 0.05, versus control and #P < 0.05, DIO + EXE versus DIO.

in the muscle of DIO + EXE rats IRS-1–PTP1B association was decreased by 1.7-fold when compared with DIO rats (Fig. 3*E* upper panel). The IRS-1 protein levels were not different between the groups (Fig. 3*E* lower panel).

# A single bout of exercise inhibits Ser307 phosphorylation of IRS-1, JNK activity and $I\kappa B\alpha$ degradation in DIO rats

Among the serine residues that become phosphorylated in response to risk factors of insulin resistance, Ser307 has been studied extensively and Ser307 phosphorylation has become a molecular indicator of insulin resistance (Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Aguirre *et al.* 2002; Hirosumi *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003); however, the effect of acute exercise on high-fat diet-induced IRS-1 serine phosphorylation has not been identified. To address this issue, we tested Ser307 phosphorylation in the gastrocnemius muscle of control, DIO and DIO + EXE rats. The muscles were blotted with anti-IRS-1 phosphoserine antibody. The high-fat diet increased IRS-1 serine phosphorylation levels in the muscle of DIO rats by 4.5-fold when compared with control rats. In the muscle of DIO + EXE rats, IRS-1 serine phosphorylation decreased by 1.7-fold when compared with DIO rats (Fig. 4*A*).

JNK activation was determined by monitoring phosphorylation of JNK (Thr183 and Tyr185) and c-Jun (Ser63), which is a substrate of JNK. The high-fat diet induced an increase in JNK phosphorylation in the muscle of DIO rats by 7.2-fold when compared with control rats. In the muscle of DIO + EXE rats, JNK serine phosphorylation decreased by 2.0-fold when compared with DIO rats (Fig. 4*B* upper panel). The JNK protein levels were not different between the groups (Fig. 4*B* lower panel). Consistent with JNK activation, c-Jun phosphorylation was 3.1-fold higher in the muscle of DIO rats when compared with control rats. In the muscle of DIO rats submitted to acute exercise, c-Jun phosphorylation decreased by 1.7-fold when compared with DIO rats



Figure 4. Effect of acute exercise on IRS-1 serine phosphorylation, JNK activity,  $I\kappa B\alpha$  degradation and IRS-1 and JNK protein levels in muscle of controls, DIO and DIO + EXE rats

Tissue extracts were immunoblotted (IB) with anti-IRS-1307 phosphoserine antibody (A upper panel), anti IRS-1 antibody (A lower panel), anti-phospho JNK antibody (B upper panel), anti-JNK antibody (B lower panel), antiphospho-c-Jun antibody (C), anti-I<sub>K</sub>B<sub> $\alpha$ </sub> antibody (D) and anti-SOCS3 (E) in control, DIO and DIO + EXE rats. The results of scanning densitometry were expressed as arbitrary units. Bars represent means ± s.E.M. of n = 6-8 rats. \*P < 0.05, versus control and #P < 0.05, DIO + EXE versus DIO.

© 2006 The Authors. Journal compilation © 2006 The Physiological Society

(Fig. 4*C*). Finally, we examined the IKK–NF- $\kappa$ B pathway, an important regulator of inflammation, in obesityand inflammation-induced insulin resistance. The main function of the IKK complex is the activation of NF- $\kappa$  B through phosphorylation and degradation of I $\kappa$  B $\alpha$ (Hevener et al. 2003; Greten et al. 2004; Viatour et al. 2005). Thus, to assess NF- $\kappa$ B activation, we observed  $I\kappa B\alpha$  degradation in the muscle of control, DIO and DIO + EXE rats. The high-fat diet led to a decrease in  $I\kappa B\alpha$ expression levels in the muscle of DIO rats by 1.9-fold, compared with control rats. However, in the muscle of DIO + EXE rats,  $I\kappa B\alpha$  degradation was decreased by 1.4-fold when compared to DIO rats (Fig. 4D). The high-fat diet increased SOCS 3 expression in the muscle of DIO rats by 2.0-fold when compared to the control; however, acute exercise did not change the high-fat diet-induced modulation of SOCS 3 expression in this tissue (Fig. 4E).

#### Discussion

Impaired insulin action on whole-body glucose uptake is a hallmark feature of type 2 diabetes mellitus. Physical exercise has been linked to improved glucose homeostasis and enhanced insulin sensitivity immediately after an acute bout of exercise in humans (Devlin et al. 1987; Zierath, 1995) and rodents (Richter et al. 1982; Wallberg-Henriksson, 1987; Wallberg-Henriksson et al. 1988). In this study, we demonstrate that a single bout of exercise partially restored the insulin signalling in muscle of obese rats by different mechanisms. High-fat diet was observed to lead to an increase in the PTP1B protein level and in the activity and serine phosphorylation of IRS-1; it is interesting that acute exercise reversed these parameters in parallel with a reduction in JNK activity and  $I\kappa B\alpha$ degradation. However, the acute exercise had no effect on high-fat diet-induced SOCS3 expression.

Several mechanisms may be involved in the pathogenesis of insulin resistance in muscle. The ability of PTP1B to negatively regulate insulin receptor kinase has been established at the molecular level (Myers et al. 2001) and ablation of the PTP1B gene yields mice displaying characteristics which suggest that inhibition of PTP1B function may be an effective strategy for the treatment of diabetes and obesity (Elchebly et al. 1999). In accordance with this, our results show decreased activity and expression of PTP1B in DIO rats after a single bout of exercise. Furthermore, the reduction of PTP1B activity in rats submitted to acute exercise was accompanied by increased insulin sensitivity in skeletal muscle and correlates with increases in tyrosyl phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2 and with reduction of IR-PTP1B and IRS-1-PTP1B association in skeletal muscle. In contrast to our results, it has been recently was reported that the amount of PTP1B associated with IR- $\beta$  is not different in the muscle of normal rats at 5, 29 and 53 h after cessation of chronic voluntary exercise (Kump & Booth, 2005). These apparent contradictory results may be related to the protocol of exercise and changes in physiological and metabolic parameters in DIO rats.

Serine phosphorylation of IRS proteins is believed to be a major mechanism of suppression of IRS-1 and IRS-2 activity that contributes to insulin resistance (Saltiel & Olefsky, 1996; Saltiel & Kahn, 2001). Regulation of serine phosphorylation of IR, IRS-1 and IRS-2 proteins has been a focus of investigation in the search for the molecular mechanism of insulin resistance. Our results show a marked reduction in IRS-1 serine phosphorylation, 16 h after acute exercise in DIO rats in parallel with an increase in IR autophosphorylation. A previous study demonstrated that treatment of cultured murine adipocytes with TNF- $\alpha$  induces serine phosphorylation of IRS-1 and converts it into an inhibitor of the IR tyrosine kinase activity in vitro (Hotamisligil et al. 1996). The IRS-1-mediated inhibition of IR tyrosine kinase activity could occur by direct or indirect interactions between the IR and IRS-1 (Backer et al. 1993; O'Neill et al. 1994). Serine-phosphorylated IRS-1 might associate with the IR to block the autophosphorylation reaction; alternatively, serine-phosphorylated IRS-1 might act indirectly on the IR through an association with an inhibitor that acts on the IR in a stoichometric or catalytic fashion (Hotamisligil et al. 1996). Taken together, these data suggest that a high-fat diet mediates insulin resistance, at least in part, by inducing IRS-1 serine phosphorylation and decreasing IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation and that this effect is inhibited by acute exercise. Studies suggest that overexpression of SOCS3 decreases insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation levels, inducing insulin resistance (Ueki et al. 2004). However, this modulation of SOCS3 by DIO was not reversed by acute exercise. As the IR-IRS-1/2 pathway is involved in glucose uptake and glycogen synthesis in muscle, we suggest that acute exercise, by acting on this pathway, reverses insulin resistance of DIO animals.

Activation of inflammatory signalling, including of the  $I\kappa B$ –NF $\kappa B$  pathway may also contribute to mediated the serine phosphorylation of IRS-1(Gao *et al.* 2002). However, few studies have examined the effect of acute exercise on the  $I\kappa B$ –NF $\kappa B$  pathway. In rats, exercise activates  $I\kappa B$ –NF $\kappa B$  signalling in muscle (Ji *et al.* 2004), and acute fatiguing exercise in humans reduces NF $\kappa B$  activity. Similar to a recent study showing that 8 weeks of aerobic exercise training reduced  $I\kappa B$ –NF $\kappa B$  signalling in vastus lateralis muscle from subjects with type 2 diabetes (Sriwijitkamol *et al.* 2006), our results show that the high levels of IRS-1, phosphorylated at Ser307, in DIO rats correlated with the disappearance of  $I\kappa B\alpha$ . This finding is an indication of IKK activation and suggests that acute

exercise is able to reduce IKK activation and restore the  $I\kappa B\alpha$  expression.

Recently, JNK has been linked to the regulation of insulin signalling by several studies (Aguirre et al. 2000, 2002; Rui et al. 2001; Hirosumi et al. 2002; Lee et al. 2003). It has been suggested that JNK contributes to insulin resistance by phosphorylating IRS-1 at Ser307, and this phosphorylation leads to inhibition of the IRS-1 function (Aguirre et al. 2000, 2002; Rui et al. 2001; Lee et al. 2003; Prattali et al. 2005). However, the effect of exercise on JNK activity remains unclear. Several studies suggest that the activity of JNK intracellular signalling cascade is increased following prolonged running exercise (Boppart et al. 2000; Thompson et al. 2003). In contrast, JNK phosphorylation was reduced after resistance exercise in old men (Williamson et al. 2003). In this study, we observed that a single bout of exercise inhibited DIO-induced JNK activity, and that this inhibition was accompanied by a reduction in IRS-1 serine phosphorylation at Ser307.

In accordance with the results of Oakes et al. (1997) we observed that a single bout of exercise completely normalized the insulin action in the diet-induced obese state; however, our data show only a partial amelioration of insulin signalling. Taken together, these data suggest that the complete normalization, by acute exercise, of the insulin action in obesity induced by diet may be caused by other factors. One possibility may be associated with the increase in other insulin-independent signalling pathways. It has been postulated that AMP kinase is a important mediator of acute exercise-induced glucose uptake in muscle (Sakamoto & Goodyear, 2002; Wojtaszewski et al. 2002; Krook et al. 2004). In addition, in human subjects with type 2 diabetes, where there is impaired insulin signalling in skeletal muscle, acute exercise results in normal activation of AMP kinase (Musi et al. 2001; Koistinen et al. 2003).

In summary, a single bout of exercise improves insulin sensitivity in DIO rats by reversing high-fat diet-induced decreases in insulin-stimulated IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation. The effect of acute exercise on insulin action is further supported by our findings that DIO + EXE rats show a reduction in PTP1B activity and IRS-1 serine phosphorylation, mechanisms by which a single session of exercise may protect against high-fat diet-induced insulin resistance. Overall, these results provide new insights into the mechanism by which physical activity restores insulin sensitivity.

#### References

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R & White MF (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* **275**, 9047–9054.

- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE & White MF (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* **277**, 1531–1537.
- Asante-Appiah E & Kennedy BP (2003). Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E663–E670.
- Azevedo JL Jr, Carey JO, Pories WJ, Morris PG & Dohm GL (1995). Hypoxia stimulates glucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **44**, 695–698.
- Backer JM, Myers MG Jr, Sun XJ, Chin DJ, Shoelson SE, Miralpeix M & White MF (1993). Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells. *J Biol Chem* **268**, 8204–8212.
- Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A & Muggeo M (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* **68**, 374–378.
- Boppart MD, Asp S, Wojtaszewski JF, Fielding RA, Mohr T & Goodyear LJ (2000). Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle. *J Physiol* **526**, 663–669.
- Bradford MM (1976). 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.
- Cheatham B & Kahn CR (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16, 117–142.
- Chibalin AV Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook A, Wallberg-Henriksson H & Zierath JR (2000). Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 38–43.
- Czech MP & Corvera S (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274, 1865–1868.
- Devlin JT, Hirshman M, Horton ED & Horton ES (1987). Enhanced peripheral and splanchnic insulin sensitivity in NIDDM men after single bout of exercise. *Diabetes* **36**, 434–439.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL *et al.* (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544–1548.
- Eldar-Finkelman H & Krebs EG (1997). Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9660–9664.
- Ferre P, Leturque A, Burnol AF, Penicaud L & Girard J (1985). A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anaesthetized rat. *Biochem J* **228**, 103–110.
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ & Ye J (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* **277**, 48115–48121.

<sup>© 2006</sup> The Authors. Journal compilation © 2006 The Physiological Society

Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR & Roth RA (2003). Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* **278**, 8199–8211.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF & Karin M (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285–296.

Henriksen EJ (2002). Invited review: effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* **93**, 788–796.

Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM & Olefsky J (2003). Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med* **9**, 1491–1497.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M & Hotamisligil GS (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333–336.

Hjeltnes N, Galuska D, Bjornholm M, Aksnes AK, Lannem A, Zierath JR & Wallberg-Henriksson H (1998). Exerciseinduced overexpression of key regulatory proteins involved in glucose uptake and metabolism in tetraplegic persons: molecular mechanism for improved glucose homeostasis. *FASEB J* **12**, 1701–1712.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF & Spiegelman BM (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665–668.

Ip YT & Davis RJ (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 205–219.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N & Vina J (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J* **18**, 1499–1506.

Kennedy JW, Hirshman MF, Gervino EV, Ocel JV, Forse RA, Hoenig SJ, Aronson D, Goodyear LJ & Horton ES (1999). Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **48**, 1192–1197.

Koistinen HA, Galuska D, Chibalin AV, Yang J, Zierath JR, Holman GD & Wallberg-Henriksson H (2003). 5-aminoimidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1066–1072.

Krook A, Wallberg-Henriksson H & Zierath JR (2004). Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 1212–1217.

Kump DS & Booth FW (2005). Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. *J Physiol* **562**, 829–838.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ & White MF (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* **278**, 2896–2902.

McGuinness OP & Mari A (1997). Assessment of insulin action on glucose uptake and production during a euglycemichyperinsulinemic clamp in dog: a new kinetic analysis. *Metabolism* **46**, 1116–1127. Major CD & Wolf BA (2001). Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* **50**, 2721–2728.

Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA & Goodyear LJ (2001). AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E677–E684.

Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D & Tonks NK (2001). TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* **276**, 47771–47774.

O'Neill TJ, Craparo A & Gustafson TA (1994). Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. *Mol Cell Biol* 14, 6433–6442.

Oakes ND, Bell KS, Furler SM, Camilleri S, Saha AK, Ruderman NB, Chisholm DJ & Kraegen EW (1997). Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* **46**, 2022–2028.

Pimenta WP, Saad MJ, Paccola GM, Piccinato CE & Foss MC (1989). Effect of oral glucose on peripheral muscle fuel metabolism in fasted men. *Braz J Med Biol Res* 22, 465–476.

Prada P, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC & Dolnikoff MS (2000). High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension* **35**, 424–429.

Prada P, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola Do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC & Saad MJ (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* **146**, 1576–1587.

Prattali RR, Barreiro GC, Caliseo CT, Fugiwara FY, Ueno M, Prada PO, Velloso LA, Saad MJ & Carvalheira JB (2005). Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in growth hormone treated animals. *FEBS Lett* **579**, 3152–3158.

Richter EA, Garetto LP, Goodman MN & Ruderman NB (1982). Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J Clin Invest* **69**, 785–793.

Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A & White MF (2001). Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* **107**, 181–189.

Saad MJ, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CR, Paiva RS & Velloso LA (1997). Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* **40**, 179–186.

Sakamoto K & Goodyear LJ (2002). Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* **93**, 369–383.

Saltiel AR & Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806.

Saltiel AR & Olefsky JM (1996). Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* **45**, 1661–1669.

 ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2006 The Authors. Journal compilation  ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2006 The Physiological Society

Scott AM, Atwater I & Rojas E (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470–475.

Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, Kusari J & Olefsky JM (1996). Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 45, 1379–1385.

Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, Berria R, Eagan P, Pratipanawatr T, Defronzo RA, Mandarino LJ & Musi N (2006). reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. *Diabetes* 55, 760–767.

Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF & Adeli K (2002). Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem* **277**, 793–803.

Thompson HS, Maynard EB, Morales ER & Scordilis SP (2003). Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **178**, 61–72.

Tonks NK (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* **546**, 140–148.

Ueki K, Kondo T & Kahn CR (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24, 5434–5446.

Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M, Kollias G & Moller DE (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* **46**, 1526–1531.

Viatour P, Merville MP, Bours V & Chariot A (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30, 43–52. Virkamaki A, Ueki K & Kahn CR (1999). Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103, 931–943.

Wallberg-Henriksson H (1987). Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand Suppl* 564, 1–80.

Wallberg-Henriksson H, Constable SH, Young DA & Holloszy JO (1988). Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J Appl Physiol* **65**, 909–913.

Weston CR, Lambright DG & Davis RJ (2002). Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* **296**, 2345–2347.

- White MF & Kahn CR (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem* **269**, 1–4.
- Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C & Trappe S (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. J Physiol 547, 977–987.

Wojtaszewski JF, Nielsen JN & Richter EA (2002). Invited review: effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans. *J Appl Physiol* **93**, 384–392.

Zierath JR (1995). In vitro studies of human skeletal muscle: hormonal and metabolic regulation of glucose transport. *Acta Physiol Scand Suppl* **626**, 1–96.

Zierath JR (2002). Invited review: exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **93**, 773–781.

#### Acknowledgements

The authors thank Mr Luiz Janeri, Jósimo Pinheiro and Márcio A da Cruz for technical assistance. This study was supported by grants from fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) and conselho nacional de Pesquisa (CNPq).

1007

# Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation

Eduardo R. Ropelle, José R. Pauli, Patrícia O. Prada, Cláudio T. de Souza, Paty K. Picardi, Marcel C. Faria, Dennys E. Cintra, Maria Fernanda de A. Fernandes, Marcelo B. Flores, Lício A. Velloso, Mario J. A. Saad and José B. C. Carvalheira

J. Physiol. 2006;577;997-1007; originally published online Sep 28, 2006;

#### DOI: 10.1113/jphysiol.2006.120006

Updated Information & Services	including high-resolution figures, can be found at: http://jp.physoc.org/cgi/content/full/577/3/997
Subspecialty Collections	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): Skeletal Muscle and Exercise http://jp.physoc.org/cgi/collection/skeletal_muscle_and_exercise
Permissions & Licensing	Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://jp.physoc.org/misc/Permissions.shtml
Reprints	Information about ordering reprints can be found online: http://jp.physoc.org/misc/reprints.shtml

#### This information is current as of March 20, 2007

Acute physical exercise reverses *S*-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein Kinase B/Akt in DIO rats.

José R. Pauli<sup>1</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>1</sup>, Dennys E. Cintra<sup>1</sup>, Marco A. Carvalho-Filho<sup>1</sup>, Juliana C. Moraes<sup>1</sup>, Cláudio T. De Souza<sup>1,2</sup>, Lício A. Velloso<sup>1</sup>, José B. C. Carvalheira<sup>1</sup>, Mario J. A. Saad<sup>1</sup>.

Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil<sup>1</sup>.

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL), São Paulo, SP, Brazil<sup>2</sup>.

Please address correspondence to: Mario José Abdalla Saad, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brasil, 13081-970, Fax: +55 19 37888950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.com.br

RUNNING TITLE: Acute exercise/insulin resistance.

#### KEYWORDS: Exercise; Insulin signaling; S-nitrosation, IRS1 and Akt

Abbreviations used are:

ACC, Acetyl-CoA Carboxylase CoA; Akt, protein kinase B/Akt; AMPK, AMP-activated protein kinase; DIO, diet-induced obesity; iNOS, inducible nitric oxide synhase; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; NO, nitric oxide; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase.

#### Abstract

Early evidence demonstrates that exogenous nitric oxide (NO) and the NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) can induce insulin resistance. Here, we investigated whether this insulin resistance, mediated by S-nitrosation of proteins involved in early steps of the insulin signal transduction pathway, could be reversed by acute physical exercise. Rats on a high-fat diet were subjected to swimming for two 3-hours-long bouts, separated by a 45-minute rest period. Sixteen hours after the exercise protocol the rats were killed and proteins from the insulin signaling pathway were analyzed by immunoprecipitation and immunoblotting. We demonstrated that a high-fat-diet led to an increase in the iNOS protein level and S-nitrosation of IRβ, IRS1 and Akt. Interestingly, an acute bout of exercise reduced iNOS expression and S-nitrosation of proteins involved in the early steps of insulin action and improved insulin sensitivity in diet-induced obesity rats. In summary, a single bout of exercise reverses insulin sensitivity in DIO rats by improving the insulin signaling pathway, in parallel to a decrease in iNOS expression and in S-nitrosation of IR/IRS-1/Akt. The decrease in iNOS protein expression in the muscle of DIO after an acute bout of exercise was accompanied by an increase in AMP-activated protein kinase (AMPK) activity. These results provide new insights into the mechanism by which exercise restores insulin sensitivity.

#### Introduction

Nitric oxide (NO) is a free radical gas and biological signaling molecule produced by the intracellular enzyme, NO synthase (Lane & Gross, 1999). The reactivity of NO towards molecular oxygen, thiols, transition metal centers, and other biological targets enables NO to act as an ubiquitous cell-signaling molecule with diverse physiological and pathophysiological roles (Gross & Wolin, 1995). In this regard, NO can react with cysteine residues in the presence of  $O_2$  to form S-nitrosothiol (Stamler *et al.*, 1992; Stamler *et al.*, 1997), altering the activity of proteins including H-ras (Lander *et al.*, 1995), the olfactory cyclic nucleotide-gated channel (Broillet & Firestein, 1996) and glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase (Molina y Vedia *et al.*, 1992). The reversible regulation of protein function by *S*-nitrosothiols function as posttranslational modifications, analogous to those created by phosphorylation or acetylation (Stamler *et al.*, 1997).

A previous study reported that inducible nitric oxide synthase (iNOS), a cytokineinducible proinflamatory mediator in several pathological conditions, is overexpressed in the muscle and fat of genetic and dietary models of obesity and type 2 diabetes (Perreault & Marette, 2001) and that this expression is associated with insulin resistance. The iNOS knockout mice are protected from muscle insulin resistance by related diet-induced obesity (Perreault & Marette, 2001). We have recently demonstrated that the insulin resistance induced by increased iNOS in obesity may be related to *S*-nitrosation of insulin signaling proteins, IR, IRS-1 and Akt (Carvalho-Filho *et al.*, 2005).

It is well established that exercise training, even acutely, can improve insulin sensitivity in the muscle of obese rats (Betts *et al.*, 1993; Bruce *et al.*, 2001). However, the molecular mechanisms involved in this improvement in insulin signaling are not fully

understood. Exercise training is also associated with enhanced APMK signaling. AMPK activation can modulate NO production through down-regulation of iNOS protein expression (Gielen *et al.*, 2003). AICAR, an AMPK agonist, treatment improves glucose homeostasis and insulin sensitivity (Winder, 2000; Fiedler *et al.*, 2001).

In the light of these previous data, we investigated whether the improvement in insulin signaling, associated with acute exercise, could be associated with the down-regulation of iNOS protein expression and reduced *S*-nitrosation of IR $\beta$ , IRS-1 and Akt, secondary to AMPK activation.

#### Materials and methods

#### Animals and diet

Male Wistar rats from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP).

The 4-wk-old Wistar rats were divided into three groups, control rats (C) fed standard rodent chow (protein, 20 kcal%; carbohydrate, 70 kcal%; lipid, 10 kcal%); obese rats, fed on an obesity-inducing diet (DIO - 20 kcal%; carbohydrate, 35 kcal%; lipid 45 kcal%) for 3 months and a third group, which also received an obesity-inducing diet, but was submitted to a single bout of exercise (DIO + EXE).

#### *Exercise protocol*

Rats were acclimatized to swimming for 10 minutes for 2 days. The animals swam for two 3-hour-long bouts, separated by a 45-minute rest period and the water temperature was maintained at  $\sim$ 34°C. This exercise protocol was adaptated from a previously published procedure (Chibalin *et al.*, 2000). After the last bout of exercise, animals were fed ad libitum and food was withdrawn six hours before tissue extraction. Sixteen hours after the exercise protocol, the rats were anesthetized with an intraperitoneal (i.p) injection of sodium thiopental (40 mg/kg body weight). Following the experimental procedures, the rats were killed under anesthesia (thiopental 200 mg/kg) following the recommendations of the NIH publication n° 85-23. Insulin tolerance test (ITT) and serum insulin quantification.

Sixteen hours after the exercise protocol, the rats were submitted to an insulin tolerance test (ITT; 1.5 IU/kg body weight of insulin). Briefly, 1.5 IU/kg of human recombinant insulin (Humulin R) from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) was infused intraperitoneally in anesthetized rats, the blood samples were collected at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes from the tail for serum glucose determination. The rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated using the formula 0.693/ (t1/2). The plasma glucose t1/2 was calculated from the slope of last square analysis of the plasma glucose was determined using a glucose meter (Advantage. Boehringer Mannheim, USA). Plasma was separated by centrifugation (1.100g) for 15 minutes at 4°C and stored at -80°C until assayed. RIA was employed to measure serum insulin, according to a previous description (Scott *et al.*, 1990).

#### Protein analysis by immunoblotting

As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the portal vein was exposed and 0.2 ml of normal saline with or without insulin (10<sup>-9</sup> mol/l) were injected. At 90 seconds after the insulin injection, both portions of gastrocnemius were ablated, pooled, minced coarsely and homogenized immediately in extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35) operated at maximum speed for 30 sec.

The extracts were centrifuged at 11,000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification, that was performed by the Bradford method (4). Proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT, run on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked, probed and developed as described previously (Laemmli, 1970; Saad *et al.*, 1997). The IR $\beta$  and IRS-1 were immunoprecipitated from rat muscle with or without previous insulin infusion in the cava vein. Antibodies used for immunoblotting were anti-phosphotyrosine, anti-IR, anti-IRS-1, anti-Akt, anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), anti-ACC, anti-phospho ACC, anti-PI3-K, (Upstate Biotechnology, MA). Blots were exposed to pre-flashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens at 80°C for 12-48 h. Band intensities were quantitated by optical desitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD) of the developed autoradiographs.

#### Detection of S-nitrosated proteins by the biotin-switch method

The biotin-switch assay was performed essentially as previously described (Jaffrey & Snyder, 2001; Martinez-Ruiz & Lamas, 2004). Muscle tissue was extracted and homogenized in extraction buffer (250 mM HEPES, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neucuproine). After centrifugation at 9000g for 20 min, insoluble material was removed and extracts were adjusted to 0.5 mg/mL of protein, and equal amounts were blocked with four volumes of blocking buffer (225 mM HEPES, pH 7.7, 0.9 mM neucuproine, 2.5% SDS, and 20 mM methylmethanethiosulfonate) at 50°C for 30 min with agitation. After blocking, extracts were precipitated with two volumes of cold acetone (-20 °C), chilled at -

20°C for 10 min, centrifuged at 2.000g at 4°C for 5 min, washed with acetone, dried out, and resuspended in 0.1 mL HENS buffer (250 mM HEPES, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neucoproine, and 1% SDS) per mg of protein. Until this point, all operations were carried out in the dark. A 1/3 volume of biotin-HPDP 4 mM and 2.5 mM ascorbic acid was added and incubated for 1 h at room temperature. Proteins were acetone-precipitated again and resuspended in the same volume of HENS buffer.

For purification of biotinylated proteins, samples from the biotin-switch assay were diluted with two volumes of neutralization buffer (20 mM HEPES, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and 15µl neutravidin-agararose per mg of protein in the initial extract was added and incubated for 1 h at room temperature with agitation. Beads were washed five times with washing buffer (20 mM HEPES, pH 7.7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and incubated with elution buffer (20 mM HEPES, pH 7.7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) and incubated with elution buffer (20 mM HEPES, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 100 mM 2-mercaptoethanol) for 20 minutes at 37°C with gentle stirring. Supernatants were collected, Laemmli buffer was added and proteins were separated by SDS-PAGE.

#### Statistical analysis

Where appropriate, the results were expressed as means  $\pm$  SEM. Differences between the lean group and sedentary obese group and between the sedentary obese and the group submitted to the exercise protocol were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a bonferroni post hoc test was performed.

#### Results

#### *Physiological and metabolic parameters*

Table 1 shows comparative data regarding controls (C), diet-induced obesity rats (DIO) and DIO rats submitted to exercise protocol (DIO+EXE). Rats fed on the high-fat diet for 12 weeks had a greater body weight, epididymal fat and fasting serum insulin than age-matched controls (C). No significant variations were found in body weight, epididymal fat and fasting serum insulin in DIO rats after a single session of exercise compared to DIO rats. The fasting glucose concentrations were similar between the groups; however the reduction in the glucose disappearance rate (Kitt), induced by the high-fat diet, was restored 16 hours after acute exercise.

#### A single bout of Exercise improves insulin signaling in the muscle of DIO rats

The effect of in vivo i.v. insulin infusion on IR tyrosine phosphorylation was examined in the gastrocnemius muscle of controls, DIO rats and DIO rats submitted to exercise. The muscles were immunoprecipitated with anti-IR antibody and then blotted with anti-phosphotyrosine antibody. Insulin induced an increase in IR tyrosine phosphorylation levels in muscle from controls, DIO rats and DIO rats submitted to a single bout of acute exercise. In the control animals, insulin increased IR tyrosine phosphorylation by 8.6-fold, compared with 2-fold increases in the muscle of DIO rats, representing reductions in IR tyrosine phosphorylation of 4.0-fold. Insulin increased IR tyrosine phosphorylation by 4.5-fold in the muscle from DIO rats submitted to the exercise protocol, representing an increase in IR tyrosine phosphorylation of 2.1-fold compared with DIO rats (Fig. 1A-upper panel). There was no difference in basal levels of IR tyrosine

phosphorylation between the three groups (data not shown). The protein expression of IR in the gastrocnemius muscle of controls, DIO rats and DIO rats submitted to the exercise protocol was quantitated by immunoprecipitation and immunoblotting with anti-IR antibody. The IR protein levels were not different between the groups (Fig. 1A-lower panel).

IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1/PI3-K association were observed to increase in control animals by 9.2- and 9.1-fold following insulin administration, respectively, compared with 1.6- and 1.7-fold increases in the muscle of DIO rats representing reductions of 6.1- and 5.5-fold in IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1/PI3-K association, respectively, and increases of 5.4- and 4.0-fold in the muscle of DIO rats submitted to acute exercise, representing increases in IRS-1 tyrosine phosphorylation and IRS-1/PI3-K association of 3.6- and -2.4 fold, respectively, compared with DIO rats (Fig.1B-upper and middle panel). Finally, in gastrocnemius muscle from control rats, insulin increased Akt serine phosphorylation by 8.7-fold, compared with a 1.9-fold increase in the muscle from DIO rats, representing a reduction in Akt serine phosphorylation of 4.4fold and an increase of 4.8-fold in the muscle of DIO rats submitted to the protocol exercise, representing an increase in Akt serine phosphorylation of 2.5-fold compared with DIO rats (Fig. 1D-upper panel). There were no differences between the basal levels of Akt serine phosphorylation in the three groups (data not shown). The protein expression of Akt in the gastrocnemius muscle of controls, DIO rats and exercised DIO rats was quantitated by immunoblotting with anti-Akt antibodies. The Akt protein levels were not different between the groups (Fig.1D-lower panel).

Acute physical exercise reverses *S*-nitrosation and restores insulin signaling in the muscle of diet-induced obesity rats.

In the muscle of DIO rats, we found an enhanced expression of iNOS (Fig. 2A). Acute exercise efficiently suppressed expression of the protein, as demonstrated by a reduction of almost 54% in iNOS protein levels in the muscle (Fig. 2A). We demonstrated an enhanced *S*-nitrosation of IR $\beta$ , IRS1, and Akt in the muscle DIO rats, which was reversed in exercised DIO rats. (Fig. 2B-2D).

AMPK activation by acute physical exercise inhibits iNOS and reverses insulin resistance in the muscle

Physical exercise stimulated AMPK activity, as reflected by increased phosphorylation of AMPK on Thr-172 (a site known to activate the enzyme (Hawley *et al.*, 1996), as well as to enhance phosphorylation of ACC; a downstream target of AMPK and a good correlate of its activation (Winder & Hardie, 1999). In the present study, we demonstrate that AMPK activation by exercise protocol reverses the insulin resistance of DIO rats. Acute physical exercise augments phosphorylation of AMPK by almost 790%, and ACC by 890% compared to the control and DIO rat groups (Fig 3A and 3B).

#### Discussion

The Impaired insulin action on whole body glucose uptake is a hallmark feature of type 2 diabetes mellitus. Physical exercise has been linked to improved glucose homeostasis and enhanced insulin sensitivity, immediately after an acute bout of exercise in humans (Devlin *et al.*, 1987; Zierath, 1995) and rodents (Richter *et al.*, 1982; Wallberg-Henriksson, 1987; Wallberg-Henriksson *et al.*, 1988). In this study, we demonstrated that a high-fat-diet leads to an increase in the iNOS protein level and S-nitrosation of IR $\beta$ , IRS1 and Akt. Interestingly, an acute bout of exercise reduces iNOS expression and S-nitrosation of proteins involved in the early steps of insulin action and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity rats.

Several mechanisms may be involved in insulin resistance in the muscle of DIO rats, including a reduction in IRS-1 and IRS-2 expressions (induced by an increased degradation or by decreased transcription of these proteins), serine phosphorylation of IR or IRSs (induced by serine kinases such as mTOR, and the stress kinases, JNK and IKK $\beta$ ), by an increase in the activity or amount of the enzymes that normally reverse insulin action (e.g., PTP1b) or by an increase in iNOS (Hotamisligil *et al.*, 1996; Bedard *et al.*, 1997; Elchebly *et al.*, 1999; Perreault & Marette, 2001; Hirosumi *et al.*, 2002; Carvalho-Filho *et al.*, 2005; Ropelle *et al.*, 2006). In several situations of insulin resistance, such as diet-induced, genetic obesity and endotoxemia, iNOS is inducted in tissues classically related to insulin signaling (Bedard *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1999). Perreault and Marette demonstrated that the genetic disruption of iNOS protects against obesity-linked insulin resistance, preventing impairments in PI3K and Akt activation by insulin in muscle (Perreault & Marette, 2001). We recently demonstrated that the insulin resistance

associated with iNOS induction is mediated by S-nitrosation of proteins involved in insulin signal transduction, i.e. insulin receptor  $\beta$ -subunit, insulin receptor substrate-1 (IRS-1), and Akt. S-nitrosation of IRB reduces its autophosphorylation and tyrosine-kinase activity and S-nitrosation of IRS-1 is associated with its reduced tissue expression (Carvalho-Filho et al., 2005; Carvalho-Filho et al., 2006). In addition, S-nitrosation of Akt is associated with a decreased serine-kinase activity of this enzyme, in basal states and after insulin stimulation S-nitrosation of these proteins is associated with down-regulation of the IRB/IRS-1/PI3K/Akt pathway. Since this pathway plays a central role in metabolic actions of insulin in the muscle, including stimulation of glucose uptake and glycogen synthesis, downregulation of this pathway in muscle by S-nitrosation may be an important mechanism of iNOS-induced insulin resistance. Interestingly, our data show that a single bout of exercise in DIO rats reduced iNOS expression and the S-nitrosation of IRB/IRS-1/Akt in skeletal muscle. In accordance, it has been recently demonstrated that a regular exercise program reduces the local expression of cytokines and iNOS in muscle biopsies (Gielen et al., 2005). Our data show that the effect of exercise, in reducing iNOS expression and decreasing S-nitrosation of proteins involved in early steps of insulin action, was accompanied by an improvement in insulin sensitivity and an increase in insulin-induced IR $\beta$ , IRS-1 and Akt phosphorylation.

The mechanism by which exercise reduces iNOS expression in DIO rats is not completely understood, but it may be mediated, at least in part, by an increase in AMPK. It is well known that exercise activates AMPK, and this is believed to contribute to its insulin-sensitizing action in situations of insulin resistance (Wojtaszewski *et al.*, 2005). Data from different sources indicate that AMPK activation reduces iNOS induction and blunts iNOS-mediated NO production (Bedard *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1997; Pilon *et al.*, 2004). In accordance with these previous data, we show that, in the muscle of DIO rats, an acute bout of exercise is accompanied by an increase in AMPK activation and a reduction in iNOS expression.

Interestingly an acute bout of exercise reduced, but did not completely reverse, the increase in iNOS and in the S-nitrosation of proteins of the insulin signaling pathway in DIO rats. However, the reversal of insulin resistance was complete; these data may suggest that a reduction in iNOS expression and in the S-nitrosation of IR/IRS-1/Akt is sufficient to completely normalize insulin sensitivity. In addition, it should be taken into consideration that insulin resistance is a metabolic situation that is related to several molecular mechanisms that act in parallel to down-regulate insulin signaling. Since exercise is an efficient way to improve insulin sensitivity, it is possible that it may also act in other mechanisms of insulin resistance. In this regard, in a similar protocol, we recently demonstrated that exercise attenuates the increase in the expression and activity of the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), and also reverses JNK activation and the increase in serine phosphorylation of IRS-1 in the muscle of DIO rats (Ropelle *et al.*, 2006). Taking these data together with our current results, we may suggest that a reduction in iNOS expression and in S-nitrosation of IR/IRS-1/Akt, in parallel with these previously mentioned mechanisms, may contribute to explain the complete reversal of insulin resistance after an acute bout of exercise in DIO rats. The decrease in iNOS protein expression in the muscle of DIO rats after an acute bout of exercise was accompanied by an increase in AMPK activity. These results provide new insights into the mechanism by which exercise restores insulin sensitivity.

#### References

- Bedard, S., Marcotte, B. & Marette, A. (1997). Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* **325** ( **Pt 2**), 487-493.
- Betts, J. J., Sherman, W. M., Reed, M. J. & Gao, J. P. (1993). Duration of improved muscle glucose uptake after acute exercise in obese Zucker rats. *Obes Res* **1**, 295-302.
- Bonora, E., Moghetti, P., Zancanaro, C., Cigolini, M., Querena, M., Cacciatori, V., Corgnati, A. & Muggeo, M. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 374-378.
- Broillet, M. C. & Firestein, S. (1996). Direct activation of the olfactory cyclic nucleotidegated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron* 16, 377-385.
- Bruce, C. R., Lee, J. S. & Hawley, J. A. (2001). Postexercise muscle glycogen resynthesis in obese insulin-resistant Zucker rats. *J Appl Physiol* **91**, 1512-1519.
- Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Carvalheira, J. B., Velloso, L. A. & Saad, M. J. (2006). Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E476-482.
- Carvalho-Filho, M. A., Ueno, M., Hirabara, S. M., Seabra, A. B., Carvalheira, J. B., de Oliveira, M. G., Velloso, L. A., Curi, R. & Saad, M. J. (2005). S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54, 959-967.
- Chibalin, A. V., Yu, M., Ryder, J. W., Song, X. M., Galuska, D., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J. R. (2000). Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 38-43.
- Devlin, J. T., Hirshman, M., Horton, E. D. & Horton, E. S. (1987). Enhanced peripheral and splanchnic insulin sensitivity in NIDDM men after single bout of exercise. *Diabetes* **36**, 434-439.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L. & Kennedy, B. P. (1999). Increased insulin

sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-1548.

- Fiedler, M., Zierath, J. R., Selen, G., Wallberg-Henriksson, H., Liang, Y. & Sakariassen, K. S. (2001). 5-aminoimidazole-4-carboxy-amide-1-beta-D-ribofuranoside treatment ameliorates hyperglycaemia and hyperinsulinaemia but not dyslipidaemia in KKAy-CETP mice. *Diabetologia* 44, 2180-2186.
- Gielen, S., Adams, V., Linke, A., Erbs, S., Mobius-Winkler, S., Schubert, A., Schuler, G. & Hambrecht, R. (2005). Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12, 393-400.
- Gielen, S., Adams, V., Mobius-Winkler, S., Linke, A., Erbs, S., Yu, J., Kempf, W., Schubert, A., Schuler, G. & Hambrecht, R. (2003). Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol 42, 861-868.
- Gross, S. S. & Wolin, M. S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* **57**, 737-769.
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D. & Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 27879-27887.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M. & Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F. & Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668.
- Jaffrey, S. R. & Snyder, S. H. (2001). The biotin switch method for the detection of Snitrosylated proteins. *Sci STKE* **2001**, PL1.
- Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C. H. & Marette, A. (1997). Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46, 1691-1700.
- Kapur, S., Marcotte, B. & Marette, A. (1999). Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* **276**, E635-641.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lander, H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F., Levi, R. & Novogrodsky, A. (1995). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270, 7017-7020.
- Lane, P. & Gross, S. S. (1999). Cell signaling by nitric oxide. Semin Nephrol 19, 215-229.
- Martinez-Ruiz, A. & Lamas, S. (2004). Detection and proteomic identification of Snitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **423**, 192-199.
- Molina y Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brune, B., Di Silvio, M., Billiar, T. R. & Lapetina, E. G. (1992). Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 267, 24929-24932.
- Perreault, M. & Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* **7**, 1138-1143.
- Pilon, G., Dallaire, P. & Marette, A. (2004). Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulinsensitizing drugs. *J Biol Chem* 279, 20767-20774.
- Richter, E. A., Garetto, L. P., Goodman, M. N. & Ruderman, N. B. (1982). Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J Clin Invest* 69, 785-793.
- Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Prada, P. O., de Souza, C. T., Picardi, P. K., Faria, M. C., Cintra, D. E., Fernandes, M. F., Flores, M. B., Velloso, L. A., Saad, M. J. & Carvalheira, J. B. (2006). Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. J Physiol 577, 997-1007.
- Saad, M. J., Maeda, L., Brenelli, S. L., Carvalho, C. R., Paiva, R. S. & Velloso, L. A. (1997). Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* 40, 179-186.
- Scott, M. D., Kuypers, F. A., Butikofer, P., Bookchin, R. M., Ortiz, O. E. & Lubin, B. H. (1990). Effect of osmotic lysis and resealing on red cell structure and function. J Lab Clin Med 115, 470-480.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. & Loscalzo, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 444-448.
- Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A. & Sucher, N. J. (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**, 691-696.

- Wallberg-Henriksson, H. (1987). Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand Suppl* **564**, 1-80.
- Wallberg-Henriksson, H., Constable, S. H., Young, D. A. & Holloszy, J. O. (1988). Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J Appl Physiol* 65, 909-913.
- Winder, W. W. (2000). AMP-activated protein kinase: possible target for treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* **2**, 441-448.
- Winder, W. W. & Hardie, D. G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277, E1-10.
- Wojtaszewski, J. F., Birk, J. B., Frosig, C., Holten, M., Pilegaard, H. & Dela, F. (2005). 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* 564, 563-573.
- Zierath, J. R. (1995). In vitro studies of human skeletal muscle: hormonal and metabolic regulation of glucose transport. *Acta Physiol Scand Suppl* **626**, 1-96.

#### Acknowledgments

The authors thank Mr. Luiz Janeri, Mr. Jósimo Pinheiro and Márcio Alves da Cruz for their technical assistance. This work was supported by Grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

**Table 1.** Characteristics of Wistar rats after 3 months on a high-fat diet (DIO), DIO rats submitted to

 exercise (DIO+EXE) and their age-mached controls.

Groups	Number of rats (n)	Body weight (g)	Epididimal fat (g)	Fasting insulin (ng/ml)	Plasma Glucose (mg/dl)	Kitt (% min)
Control	8	424,7 ± 22,1	6,21 ± 1.1	3,24 ± 0,14	76,8 ± 5,9	$3,82 \pm 0,2$
DIO	8	573,5 ± 33,8*	12,37 ± 1,5*	$7,87 \pm 0,86*$	86,7 ± 6,9	1,91 ± 0,4*
DIO+EXE	8	575,1 ± 26,5*	12,63 ± 1,3*	6,41 ± 1,8*	85,63 ± 9,6	4,72 ± 0,6**

\**P*<0.001 vs. control group and \*\**P*<0.001 vs. DIO

#### **Figure Legends**

**Figure 1**. Insulin signaling in the muscle of controls, DIO and DIO rats submitted to exercise. Muscle extracts from rats injected with saline or insulin were prepared as described in Materials and Methods. Tissue extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-IR $\beta$  antibody and immunoblotted (IB) with anti-PY antibody (A-upper panel) or anti-IR $\beta$  antibody (A-lower panel). Tissue extracts were also IP with anti-IRS1 antibody and IB with anti-PY antibody (B-upper panel), anti –PI(3)K antibodies (B –middle panel) or anti-IRS1 (B-lower panel). Muscle extracts were IB with anti-phospho Akt and anti-Akt antibody (C-upper and lower panel respectively). The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Bars represent means  $\pm$  SE of eight rats. \**P*<0.05, vs. DIO rats.

**Figure 2-** *S*-nitrosation of IR $\beta$ , IRS1, and Akt in muscle. (A) iNOS expression in the muscle of Controls, DIO and DIO rats submitted to exercise. *S*-nitrosation of IR $\beta$  (B), IRS1 (C), and Akt (D) is shown, as etermined by the biotin-switch method. Bars represent means  $\pm$  SE of eight rats. \**P*<0.05, vs. control and #*P*<0.05, DIO+EXE vs. DIO.

**Figure 3**- Effect of exercise on AMPK phosphorylation in muscle of controls, DIO and DIO rats submitted to exercise. Muscle tissue extracts were immunoblotted (IB) with anti phospho-AMPK and anti-phospho-ACC antibody (A and B-upper panel), anti-AMPK antibody and anti-ACC (A and B-lower panel). The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Bars represent means  $\pm$  SE of eight rats. \**P*<0.05, vs. control and #*P*<0.05, DIO+EXE vs. DIO.

### Figure 1











# Figure 2



# Figure 3

