

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



TIAGO CASTRO DE PÁDUA MARTINELLI

**“EFEITO DA NATAÇÃO NA SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À  
INSULINA EM RATOS”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
TIAGO CASTRO DE PÁDUA MARTINELLI  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dora Maria Grassi-Kassise".

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Funcional e Molecular, na área de  
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassise

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>M366e</b>	<p>Martinelli, Tiago Castro de Pádua Efeito da natação na sensibilidade periférica à insulina em ratos / Tiago Castro de Pádua Martinelli. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Adipócitos. 2. Glicose. 3. Insulina – Efeito fisiológico. 4. Rato - Exercícios. I. Grassi-Kassisse, Dora Maria, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** The effect of swimming training on insulin stimulated glucose uptake of rats.

**Palavras-chave em inglês:** Adipocytes; Glucose; Insulin – Physiological effects; Rats - Exercises.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Dora Maria Grassi-Kassisse. Miguel Arcanjo Areas, Carlos Alberto Silva.

**Data da defesa:** 11/09/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 11 de Setembro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

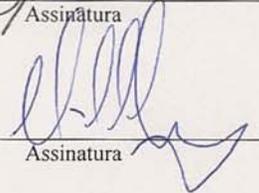
Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse (Orientadora)



---

Assinatura

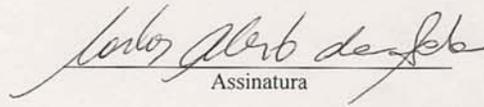
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas



---

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



---

Assinatura

Prof. Dr. Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto

---

Assinatura

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

---

Assinatura

**RESUMO**

Está bem descrito na literatura que o exercício físico aeróbio estimula a maior captação de glicose predominantemente no músculo esquelético e que o tecido adiposo branco também participa do aumento da captação de glicose estimulada pela insulina em indivíduos exercitados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade à insulina em adipócitos de ratos submetidos ao modelo de natação implantado no Labeest. Ratos Wistar adultos foram submetidos à sessões diárias de natação (50 min, 5 vezes por semana, durante 28 dias) e foi observado que ao final do protocolo experimental os ratos apresentaram redução do ganho de peso corpóreo e do consumo médio de ração. O ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico demonstrou, através taxa de infusão de glicose (GIR), que a natação induziu maior sensibilidade dos tecidos à insulina (C:  $509,2 \pm 30,5$  mg/Kg/min; N:  $679,1 \pm 26,6$  mg/Kg/min). As análises de quantificação de expressão total das proteínas GLUT 4 e AMPK em tecido adiposo isolado mostraram um aumento significativo apenas no GLUT 4. A quantidade de lactato basal produzida pelos adipócitos isolados de ratos exercitados foi significativamente maior que aquela observada nos ratos controle (C:  $0,1977 \pm 0,0640$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min; N:  $0,2818 \pm 0,0454$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min). Além disso, os agonistas não aumentaram a produção de lactato nos adipócitos isolados de ratos exercitados. O prazosin aumentou significativamente a produção de lactato pela ação da noradrenalina, em adipócitos de ratos exercitados (C:  $0,9596 \pm 0,2490$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min; N:  $1,2180 \pm 0,3055$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min). Por outro lado o protocolo de natação não alterou a produção e liberação de glicerol basal (C:  $0,0716 \pm 0,0207$   $\mu\text{mol glicerol } 10^6$  cels/60 min) ou estimulada, enquanto o prazosin inibiu a produção de glicerol pela noradrenalina (C:  $0,5132 \pm 0,1023$  ; N:  $0,4681 \pm 0,0331$   $\mu\text{mol glicerol } 10^6$  cels/60 min) em adipócitos isolados desses animais. O exercício de natação, conforme modelo proposto, promove aumento na captação de glicose devido a uma maior expressão de transportadores GLUT 4, sendo que esta glicose, captada no adipócito, constituiu-se em fonte para a produção de lactato, uma vez que a via lipolítica não foi alterada.

**ABSTRACT**

It is well described in the literature that aerobic physical exercise stimulate glucose uptake and this is mainly associated with skeletal muscle. However, it has been related that white adipose tissue also contributes to insulin increase glucose uptake after the physical training. The aim of this work was to evaluate insulin sensitivity in rats white adipocytes submitted to the model of swimming proposed to Labeest. Adult Wistar rats had been submitted to the daily sessions of swimming (50 min, 5 times per week, during 28 days). At the end of protocol rats that had swum presented reduction of the profit of corporeal weight and the average consumption of chow. The euglycemic-hyperinsulinemic clamp assays demonstrated that swimming induced increase in tissue insulin sensitivity (C:  $509.2 \pm 30.5$  mg/Kg/min; N:  $679.1 \pm 26.6$  mg/Kg/min). The analyses of quantification of total expression of proteins GLUT 4 and AMPK in adipose tissue had shown a significant increase only in GLUT 4. The amount of basal lactate produced by the isolated adipocytes of exercised rats was significantly higher that observed in control rats (C:  $0.1977 \pm 0.0640$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min; N:  $0.2818 \pm 0.0454$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min). Moreover, the agonists had not increased the lactate production in the isolated adipocytes of exercised rats. Prazosin significantly increased the lactate production stimulated by noradrenaline in adipocytes of exercised rats (C:  $0.9596 \pm 0.2490$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min; N:  $1.2180 \pm 0.3055$   $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6$  cels/60 min). On the other hand the swimming protocol did not modify the production of basal (C:  $0.0716 \pm 0.0207$   $\mu\text{mol glycerol } 10^6$  cels/60 min) or stimulated release of glycerol, while prazosin inhibited the production of glycerol induced by the noradrenaline (C:  $0.5132 \pm 0.1023$   $\mu\text{mol glycerol } 10^6$  cels/60 min; N:  $0.4681 \pm 0.0331$   $\mu\text{mol glycerol } 10^6$  cels/60 min) in isolated adipocytes of these animals. Concluding, the exercise of swimming in the considered model increased the glucose uptake due to a higher expression of transporters GLUT 4. This glucose, once in the adipocytes, seems to be the main source for the lactate production because the lipolytic way was not modified.

vi  
**SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>viii</b>
<b>AGRADECIMENTO</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Animais</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Protocolo de exercício físico</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Controle da evolução ponderal e consumo de ração</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Cateterização dos Vasos Sanguíneos</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Isolamento de Adipócitos</b>	<b>15</b>
<b>3.7 Estudo Farmacológico</b>	<b>15</b>
<b>3.8 Determinação do Lactato no Meio de Incubação</b>	<b>16</b>
<b>3.9 Determinação do Glicerol no Meio de Incubação</b>	<b>17</b>
<b>3.10 Identificação e quantificação protéica por “Western Blot”</b>	<b>18</b>
<b>3.11 Análise Estatística</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>20</b>

<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado a minha mãe que sempre me aconselhou e apoiou em todas as decisões, canalizando meus atos para a honestidade.

## AGRADECIMENTOS

Para mim, é muito difícil escrever este item “Agradecimentos”, pois acho injusto, apenas por palavras, demonstrar, a todas as pessoas que me cercam, o quanto elas foram e são importantes em minha vida. Na minha opinião, família e AMIGOS, devemos preservar como jóias raras. Vou relacionar abaixo àqueles que fizeram parte diretamente da minha tese de mestrado, pois caso contrário, graças a Deus, o item “Agradecimentos” poderia ficar com muitas páginas além.

Quero agradecer primeiramente ao meu pai e as minhas irmãs, Fernanda e Renata, que estão sempre ao meu lado quando preciso, seus respectivos Finocchio e Gustavo, meus avós, Lucinha e Darcy, que me aconselham sobre os valores da vida e a importância de Deus em nossa existência, e a minha esposa Thaís que me faz, a cada dia, valorizar e agradecer a vida que tenho.

Ao pessoal do LABEEST, que me recebeu de braços abertos me respeitando e ajudando nos experimentos. Jú e Elaine pouca convivência, mas essencial em meu início nas pesquisas. Danilinho, meu chefe do laboratório, que me orientou sobre muitas decisões e foi peça fundamental para a existência desta tese. Ao Guto, eterno bixo, a tia Edla, Márcia e seu pessoal (Danusa e Alynne), Débora, Daniela, Larissa, Carol, as meninas da farmácia (Carol e Amanda), Héder, Carol babalu, Rodrigo, Paty.

Aos alunos do laboratório 14, pelas companhias no almoço e as vezes uma cervejinha: Tiago, Amon, Andressa, Flávia e Ana Paula.

A Letícia, que apesar de fazer parte do laboratório 14 merece um agradecimento especial, pelas ajudas em meus experimentos, assim como em discussões teóricas. Você foi decisiva para meu crescimento como aluno de pós-graduação. Muito obrigado.

Aos alunos do professor Miguel: Gu e Marcelão pelas conversas e risadas durante a natação dos ratos; Luizão “marmitão”, sempre presente, alegrando nosso laboratório.

Aos funcionários Juvenal, Washington e Lécio (bioteristas), Priscila e Marcelo, Alexandra, Ivo, Rafael, Andréia e Silvia e a todos os outros alunos e professores do departamento pelos momentos de descontração durante os cafezinhos matinais e ajuda nos experimentos.

Aos amigos de fora do departamento que também contribuíram, de alguma forma, para o desenvolvimento da tese: Carlos da ecologia, pelas risadas e conversas que proporcionou em nossos almoços no bandex; Danilo da bioquímica, sempre solicito quando preciso; DU da FCM, que contribuiu diretamente na realização de alguns experimentos.

Ao Rafa, grande amigo e companheiro de PUC, UNICAMP, monografia, mestrado e da vida pessoal, pessoa responsável por me colocar no caminho da pesquisa.

Professora, orientadora e amiga DORA, que me recebeu em seu laboratório, confiando em meu trabalho. Se hoje eu tenho um conhecimento mais aprimorado, a senhora tem participação direta. Obrigado pelos conselhos de vida, que foram e com certeza serão seguidos.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AGL – Ácidos graxos livres

AMP – Monofosfato de adenosina

AMP<sub>c</sub> – Monofosfato cíclico de adenosina

AMPK – Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

ATP – Trifosfato de adenosina

AUC – Área sob a curva

C - Controle

CAP – Proteína associada a Cbl

cels - células

C3G – Guanine-nucleotide-exchange factor

cm – centímetros

dL – Decilitros

EPM – Erro Padrão da Média

g - Gramas

GDP – Guanosina Difosfato

°C – Graus Celsius

G<sub>i</sub> – Proteína G inibitória

GIR – Taxa de infusão de glicose

GLUTs – Transportador de glicose

G<sub>s</sub> – Proteína G estimulatória

GTP – Guanosina Trifosfato

h - hora

HMIT1 – Transportador mio-inositol

HSL – Lipase-hormônio-sensível

i.m. – intra-muscular

IRS – Substrato de receptor de insulina

Kg - Quilograma

KRBA – Krebs Ringer Bicarbonato Albumina

KR-HEPES - Krebs Ringer Hepes

M – Molar

MAP – Proteína kinase ativadora de mitógeno

MCT – Transportador de monocarboxilato

mg – miligrama

min - minuto

mL – Mililitros

mM - Milimolar

mRNA – RNA mitocindrial

mU – miliunidade

N - Natação

nm – Nanômetros

PDK1 – Proteína quinase dependente de fosfoinositídeo

PE10 – Tubo de polietileno tamanho 10

PE50 – Tubo de polietileno tamanho 50

PI-4,5 P<sub>2</sub> – Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato

PI-3,4,5 P<sub>3</sub> – Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato

PI3-K – Fosfatidil inositol 3 quinase

PKA – Proteína quinase dependente do monofosfato cíclico de adenosina

PKB – Proteína quinase B

PKC $\alpha$  – Proteína quinase C atípica

SH2 – Domínio homólogo ao SHC 2

TG – Triacilglicerol

$V_{\max}$  – Atividade intrínseca

$\mu\text{g}$  – Microgramas

$\mu\text{L}$  – Microlitros

$\mu\text{M}$  – Micromolar

$\mu\text{mol}$  - Micromol

**LISTA DE TABELAS**

- 1 - Média do consumo de ração e pesos inicial e final de ratos submetidos ou não a 4 semanas de natação. 20
- 2 - Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC, mg/dL) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (protocolo I). 22
- 3 - Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC, mg/dL) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (protocolo II). 25

**LISTA DE FIGURAS**

- 1 - Valores glicêmicos (A, mg/dL) e taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos. 23
- 2 - Valores glicêmicos (A, mg/dL) e valores de taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. 26
- 3 - Expressão protéica da GLUT 4 total (A) e AMPK total (B) de adipócitos isolados de ratos controle (n=4) e submetidos a 4 semanas de natação (n=4). 27
- 4 - Produção de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) gelo (A e C) e basal (B e C) pelos adipócitos epididimal isolados de ratos controle (C: n = 9) e submetidos ao protocolo de natação (N: n = 10). 29
- 5 - Produção basal (adipócitos incubados na ausência de agonistas ou antagonistas) e produção máxima de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ). 31
- 6 - Produção de lactato, em área sob a curva (AUC,  $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ céls}/60 \text{ min}$ ), estimulada por agonistas noradrenalina (NOR,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M). 32
- 7 - Produção de glicerol ( $\mu\text{mol} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) gelo (A e C) e basal (B e C) pelos adipócitos epididimal isolados de ratos. 34
- 8 - Produção basal (adipócitos incubados na ausência de agonistas ou antagonistas) e produção máxima de glicerol ( $\mu\text{mol glicerol} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) estimulada por agonistas noradrenalina (NOR) e isoprenalina (ISO). 36
- 9 - Produção de glicerol, em área sob a curva (AUC,  $\mu\text{mol glicerol} \cdot 10^6 \text{ céls}/60 \text{ min}$ ), estimulada por agonistas noradrenalina (NOR,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) e isoprenalina (ISO,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M). 37

## 1. INTRODUÇÃO

A glicose é fonte fundamental de energia para todas as células eucarióticas. Em humanos, apesar de todas as células utilizarem principalmente a glicose quando necessitam de energia, o principal consumidor em condições basais é o cérebro contando com 80% do consumo total (BRYANT *et al.*, 2002). Mecanismos de controle fisiológico mantêm a concentração de glicose plasmática (glicemia) dentro de uma faixa limítrofe que varia de 4 a 7 mM (90 - 100 mg/dL) em indivíduos normais (SUH *et al.*, 2007; HUANG & CZECH, 2007), resultante do balanço entre a absorção intestinal, produção hepática e captação e metabolismo da glicose pelos tecidos periféricos. (SALTIEL & KAHN, 2001).

A insulina e o glucagon, dois hormônios produzidos e liberados pelo pâncreas endócrino, têm ação fundamental na homeostasia glicêmica perante os diferentes estados nutricionais do dia-a-dia (alimentado e jejum). Durante o jejum, a concentração de glicose no sangue tende a diminuir (hipoglicemia). Neste momento, ocorre a secreção de glucagon pelas células alfa pancreáticas que, atuando no fígado, estimula principalmente a quebra do glicogênio em glicose (glicogenólise) e a formação da nova glicose (gliconeogênese). A glicose é então liberada para a circulação, normalizando a glicemia (GUYTON & HALL, 2007).

Quando há um aumento da glicemia no sangue (hiperglicemia) como, por exemplo, após uma refeição, a insulina é liberada pelas células beta pancreáticas aumentando a captação de glicose que será metabolizada ou armazenada sob a forma de glicogênio nas células musculares, adiposas e hepáticas (SALTIEL & KAHN, 2001). Este processo denominado glicogênese ocorre, principalmente, nas células hepáticas e musculares, capazes de armazenar 5 – 8% e 1 – 3%, respectivamente, seu peso em glicogênio (GUYTON & HALL, 2007). A insulina tem ainda a ação de inibir a produção hepática

de glicose (glicogenólise e gliconeogênese) atuando assim como o regulador primário da concentração de glicose sanguínea (SALTIEL & KAHN, 2001; HUANG & CZECH, 2007).

As membranas celulares não são naturalmente permeáveis à glicose. Para que a glicose entre na célula há a necessidade de transportadores, que facilitam a passagem desta macromolécula. Estes transportadores são formados por uma família de proteínas carreadoras específicas de glicose, e denominadas de GLUTs, composta de 13 membros (GLUT-1 a 12 e o transportador mio-inositol HMIT1) (SILVERMAN, 1991; KAHN, 1994; MUECKLER, 1994; BRYANT *et al.*, 2002).

A expressão dos GLUTs na membrana celular ocorre de maneira dependente ou não da ação da insulina. Atualmente, os compostos que melhor identificam esta família são os transportadores de glicose classe I (GLUT 1 a 4) (KHAN & PESSIN, 2002). Em adipócitos e miócitos encontramos uma captação basal independente de insulina, mediada pelo GLUT-1 e captação dependente da insulina, mediada pelo GLUT-4 (JAMES *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1991; LAWRENCE *et al.*, 1992; STUART *et al.*, 2000; DUCLUZEAU *et al.*, 2002; STUART *et al.*, 2006).

A insulina aumenta a captação de glicose nas células adiposas e musculares estimulando, principalmente, a translocação de GLUT-4 de vesículas intracelulares para a superfície da membrana (SALTIEL & KAHN, 2001). Este processo complexo se inicia com a ligação da insulina a seu receptor específico de membrana.

O receptor de insulina é uma proteína transmembrana heterotetramétrica que possui duas subunidades: a subunidade alfa localiza-se na porção extracelular da membrana plasmática e apresenta o sítio de ligação à insulina; a subunidade beta atravessa a membrana plasmática e possui uma atividade tirosina quinase intrínseca na porção intracelular (SALTIEL & KAHN, 2001; KHAN & PESSIN, 2002; MEYETS, 2004).

Quando a insulina se liga à subunidade alfa, ocorre auto-fosforilação e conseqüente ativação da porção intracelular da subunidade beta que recruta e fosforila uma família de substratos do receptor de insulina (IRS<sub>1-4</sub>) localizado no citosol (CHEATHAM & KAHN, 1995; DUCLUZEAL *et al.*, 2002; KHAN & PESSIN, 2002; MEYETS, 2004; LAVIOLA *et al.*, 2006; HUANG & CZECH, 2007). A ativação dos IRSs promove o recrutamento e conseqüente ativação de proteínas que contenham o domínio SH2 (SHC homology domain 2) os quais reconhecem o resíduo tirosina fosforilado desses substratos (SALTIEL & KAHN, 2001; KHAN & PESSIN, 2002; LAVIOLA *et al.*, 2006). Uma dessas proteínas é a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3-K) que é ativada em sua subunidade regulatória p85 (DUCLUZEAL *et al.*, 2002; KHAN & PESSIN, 2002; LAVIOLA *et al.*, 2006). Esta proteína catalisa a fosforilação de fosfolipídios de inositol da membrana plasmática, como o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI-4,5 P<sub>2</sub>), que é fosforilado a fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PI-3,4,5 P<sub>3</sub>) (CHEATHAM & KAHN, 1995; CZECH & CORVERA, 1999; SALTIEL & KAHN, 2001; DUCLUZEAL *et al.*, 2002; KHAN & PESSIN, 2002; BRYANT *et al.*, 2002; LAVIOLA *et al.*, 2006; HUANG & CZECH, 2007).

A concentração aumentada de PI-3,4,5 P<sub>3</sub> na membrana plasmática recruta e ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositídeo (PDK1), uma serina/treonina quinase (PETERSON, 1999; KHAN & PESSIN, 2002) que ativa outras proteínas com atividade serina/treonina quinase: AKT/PKB e PKC $\lambda$  atípica (ALESSI *et al.*, 1997; CZECH & CORVERA, 1999; SALTIEL & KAHN, 2001; DUCLUZEAL *et al.*, 2002; BRYANT *et al.*, 2002; HUANG & CZECH, 2007). As proteínas AKT/PKB e PKC $\lambda$  atípica estimulam, através de mecanismos não totalmente conhecidos, a migração reversível de um “pool” intracelular das proteínas carreadoras GLUT-4 para a membrana celular (CZECH & CORVERA, 1999; SALTIEL & KAHN, 2001; KHAN & PESSIN, 2002; BRYANT *et al.*, 2002;

HOLLAND *et al.*, 2007). A insulina estimula também um aumento da atividade intrínseca ( $V_{\max}$ ) da proteína carreadora, GLUT-4 (BALY & HORUK, 1988; BELL *et al.*, 1990).

Esta via da PI3-K é essencial para o transporte de glicose estimulado pela insulina, mas há outro caminho que também pode exercer forte influência na captação de glicose estimulada pela insulina e independe da PI3-K, via c-Cbl associado a CAP (Cbl *associated protein*) descrito abaixo.

O receptor de insulina, uma vez fosforilado, ativa a proteína c-Cbl via associação ao CAP dentro dos bolsões de lipídios ricos em caveolinas (RIBON *et al.*, 1998; SALTIEL & KAHN, 2001; KHAN & PESSIN, 2002). Este caminho tem interesse particular, pois a proteína CAP é restrita ao tecido adiposo (RIBON *et al.*, 1998; SALTIEL & KAHN, 2001; KHAN & PESSIN, 2002). A proteína c-Cbl ativada, recruta e ativa a proteína C3G (guanine-nucleotide-exchange factor) através do domínio SH2 da proteína adaptadora CrKII. O complexo CAP/Cbl/CrKII/C3G estimulado, promove a conversão do GDP, ligado a proteína TC10, em sua forma ativa GTP e esta proteína ativada pode estar relacionada com o transporte de GLUT-4 para a membrana plasmática (CZECH & CORVERA, 1999; SALTIEL & KAHN, 2001; DUCLUZEAL *et al.*, 2002; KHAN & PESSIN, 2002; BRYANT *et al.*, 2002; HUANG & CZECH, 2007).

A insulina promove, ainda, através de seu receptor de membrana e do substrato de receptor, a ativação da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAP), que através de uma cascata de reações ativa a expressão gênica para a proteína GLUT-4 (SALTIEL & KAHN, 2001).

Outra proteína que vem sendo estudada nas últimas décadas e pode estar relacionada com o aumento da entrada de glicose na célula é a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK). A via da AMPK se assemelha à via da insulina ao estimular a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (HARDIE, 2003; TOWLER & HARDIE, 2007). A diferença entre estes dois mecanismos está no caminho percorrido pela glicose. Enquanto a insulina estimula a formação de

glicogênio a partir da glicose (reação anabólica), a AMPK estimula a glicólise e a oxidação desta glicose (reação catabólica) (HARDIE, 2003; TOWLER & HARDIE, 2007).

Esta enzima está principalmente envolvida na manutenção da homeostase energética da célula, sendo ativada quando há um incremento na proporção AMP:ATP, em decorrência principalmente do aumento no consumo de ATP (HARDIE, 2003; HARDIE & SAKAMOTO, 2006; TOWLER & HARDIE, 2007). Assim, este processo catabólico, ativado pela AMPK, promove a formação de novas moléculas de ATP restabelecendo a razão AMP:ATP e preparando o músculo para o exercício subsequente (HARDIE, 2003).

Em determinadas condições patológicas, como o diabetes mellitus tipo II, doses fisiológicas do hormônio insulina são ineficientes em promover a queda da glicemia (McGARRY, 2002; BRYANT *et al.*, 2002; HOLLAND *et al.*, 2007). Esta condição denominada resistência à insulina é definida como uma deficiência na ação da insulina em evitar a liberação de glicose pelo fígado bem como de promover a entrada de glicose em tecidos periféricos (McGARRY, 2002; BRYANT *et al.*, 2002).

Um dos mais relevantes fatores de risco para o desenvolvimento da diabetes tipo II é a obesidade (McGARRY, 2002), sendo que cerca de 80% dos diabéticos são obesos (SMYTH & HERON, 2006). Indivíduos com resistência à insulina frequentemente apresentam sinais de metabolismo anormal de lipídio como o aumento da concentração de ácido graxo livre circulante e excesso de lipídio intramiocelular (HOLLAND *et al.*, 2007). KIM *et al.* (2000), demonstraram que ratos alimentados durante 3 semanas com dieta rica em lipídio apresentaram resistência à insulina em tecido muscular. Relataram também diminuição da atividade glicogênio sintase, enzima que promove a glicogênese, e acúmulo de glicose-6-fosfato no líquido intracelular o que conseqüentemente leva a diminuição da entrada de glicose. Estudos demonstraram que a diminuição na captação de glicose em

ratos alimentados com dieta rica em lipídio também foi verificada em tecido adiposo e estava relacionada a uma queda na quantidade de GLUT-4 (KAHN, 1994).

Outros estudos sugerem que os metabólitos de lipídio, uma vez dentro da célula, ativam uma cascata de reação que promove a fosforilação dos IRSs nos aminoácidos serina/treonina, o que impede a fosforilação e conseqüente ativação deste substrato em tirosina (DOBBINS *et al.*, 2001 ; PETERSEN & SHULMAN, 2006 ; HUANG & CZECH, 2007).

Por outro lado, já está bem descrito na literatura que o exercício físico aeróbio estimula uma maior captação de glicose pelo organismo e que esta captação aumentada está predominantemente relacionada ao músculo esquelético (KIM *et al.*, 2000 e FUEGER *et al.*, 2004).

Já foi constatado que o treinamento físico aumenta a sensibilidade à insulina através da produção de novas moléculas de GLUT-4, maior translocação desta proteína para a membrana plasmática (KIM *et al.*, 2000) e maior atividade da enzima hexoquinase, que promove a formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose que entrou na célula (KIM *et al.*, 2000; FUEGER *et al.*, 2004).

Contudo, não só as células musculares são alteradas em relação ao metabolismo da glicose após o treinamento físico, o tecido adiposo branco também tem uma parcela de participação no aumento da captação de glicose estimulada pela insulina. O efeito gerado pelo exercício físico no tecido adiposo está relacionado com aumento na expressão total da proteína GLUT-4, assim como na transcrição do gene GLUT-4 mRNA. (STALLKNECHT *et al.*, 1993; HIRSHMAN *et al.*, 1993). A atividade intrínseca do transportador de glicose não sofre modificação após sessão de treinamento, comprovando que a maior captação de glicose foi em virtude do aumento no número de GLUT-4 realizando a captação de glicose na membrana celular (HIRSHMAN *et al.*, 1993).

Esta glicose captada em maior número pelo adipócito pode estar sendo utilizada como precursora de triglicérides para reposição deste lipídio que foi oxidado durante o exercício físico

(VINTEN & GALBO, 1983; HIRSHMAN *et al.*, 1993), assim como, precursora de lactato, que é liberado na corrente sanguínea e utilizado nas células hepáticas como fonte para a gliconeogênese, através do ciclo de Cori (DIGIROLAMO *et al.*, 1992; QVISTH *et al.*, 2008). A produção de lactato a partir da glicose e sua liberação foram reconhecidas como uma nova função do tecido adiposo (DIGIROLAMO *et al.*, 1992; FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996b) e hoje está bem estabelecido que o tecido adiposo é uma fonte importante de liberação de lactato (QVISTH *et al.*, 2008). Foi demonstrado que dentro do adipócito, o lactato é um produto metabólico importante da glicose, contanto com 5-10% do metabolismo de glicose em adipócitos pequenos, mas entre 45-50% deste metabolismo em grandes adipócitos (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1996b).

Durante os últimos 50 anos, o tecido adiposo foi principalmente conhecido como um reservatório passivo de energia que fornecia ácidos graxos livres (AGL) como fonte de energia quando outros tecidos necessitavam (TOMAS *et al.*, 2004; BERGGREN *et al.*, 2005). Já no final do século passado esta perspectiva começou a mudar com a suspeita do tecido adiposo como um órgão endócrino (TOMAS *et al.*, 2004; CHUDEK & WIECEK, 2006). Esta informação se solidificou na década de 80 com a descoberta da leptina, o hormônio da saciedade, secretado pelo tecido adiposo, que nos permitiu modificar a maneira como olhamos o tecido adiposo em relação ao metabolismo de nutriente. Além da leptina, outras citocinas com funções autócrinas, parácrinas e endócrinas incluindo fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interleucina-6, resistina, vifastina, proteína estimulatória de acilação e adiponectina foram identificadas como sendo secretadas pelo tecido adiposo. Estas substâncias são coletivamente denominadas como adipocitocinas e regulam a homeostasia energética, juntamente com o organismo, atuando diretamente na captação e liberação de energia (MINER, 2004; BERGGREN *et al.*, 2005; LAVIOLA, 2006; GRAY & VIDAL-PUIG, 2007).

Hoje sabemos que o tecido adiposo libera mais de 20 substâncias na circulação o que o tornou o órgão endócrino que libera maior quantidade de substâncias, pelo menos até o presente momento (TOMAS *et al.*, 2004).

O controle da função do tecido adiposo é realizado principalmente por catecolaminas e envolve, pelo menos, 5 diferentes tipos de adrenoceptores; 3 adrenoceptores  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) e 2 adrenoceptor  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) (ARNER, 1992; LAFONTAN & BERLAN, 1993; LAFONTAN & BERLAN, 1995; STICH *et al.*, 2000; LANGIN, 2006).

Quando estimulado, os adrenoceptores  $\beta$ , que estão intimamente ligados a adenililciclase através da proteína G estimulatória ( $G_s$ ), promovem aumento da produção intracelular de monofosfato cíclico de adenosina ( $AMP_c$ ) e ativação da proteína quinase dependente do monofosfato cíclico de adenosina (PKA). Por fim, a PKA, em sua forma ativa, promove a fosforilação e conseqüente estimulação da enzima lipase-hormônio-sensível (HSL) (STRALFORS & BELFRAGE, 1983; LANGIN *et al.*, 1996; LANGIN, 2006) e das perilipinas, iniciando o processo de hidrólise dos triacilgliceróis em AGL e glicerol (SZTALRYD & KRAEMER, 1994; ENEVOLDSEN *et al.*, 2001; LANGIN, 2006).

As catecolaminas também podem exercer um efeito antilipolítico no adipócito através da estimulação do adrenoceptor  $\alpha_2$ . Ativação deste receptor, que está acoplado a proteína G inibitória ( $G_i$ ), leva a uma diminuição do nível de  $AMP_c$  intracelular, interrompendo a cascata de reações que culminaria na fosforilação da enzima HSL e conseqüente hidrólise de triacilglicerol (TG) (LANGIN, 2006).

A regulação da lipólise em tecido adiposo branco possui um ajuste fino e bem controlado pois os adrenoceptores que ativam a adenilil ciclase ( $\beta$ -adrenocpetores) coexistem na mesma célula adiposa

dos adrenoceptores que inibem a adenilil ciclase ( $\alpha_2$ .adrenocetore) e ambos receptores são estimulados por catecolaminas (LAFONTAN & BERLAN, 1995).

Além dos adrenoceptores, a enzima AMPK também pode estar envolvida na regulação da lipólise. Em situações de estresse, como no exercício físico, esta proteína é ativada e fosforila o HSL em seu aminoácido ser-565 (WATT *et al.*, 2004; DAVAL *et al.* 2006; TOWLER & HARDIE, 2007), impedindo a ação da PKA que fosforila este hormônio em sua unidade ser-563 (WATT *et al.*, 2004; DAVAL *et al.*, 2006). É importante lembrar que o exercício físico também estimula o sistema nervoso simpático que através dos receptores  $\beta$  adrenérgicos aumenta a concentração intracelular de AMPc e este segundo mensageiro está relacionado com a ativação da AMPK (DAVAL, *et al.*, 2006).

Como a resposta do adipócito ao estímulo  $\beta$  adrenérgico é a lipólise e a AMPK inibe este processo, esta proteína quinase pode estar atuando como um mecanismo de *feedback*, limitando a quebra excessiva de triacilglicerol. Quando há lipólise em excesso, o ácido graxo intracelular pode ser reconvertido em triacilglicerol, sendo este um processo anabólico que consome energia (DAVAL *et al.*, 2006). .

O estilo de vida ocidentalizado, com dietas ricas em gordura e sedentarismo, tem acarretado muitas desordens metabólicas na saúde do homem moderno (KIM, 2000; STULNIG & WALDHAUSL 2004; SUKHIJI *et al.*, 2006). Doenças como a Síndrome Metabólica, hipertensão e diabetes tipo II estão entre as mais acometidas (ENEVOLDSEN *et al.*, 2000; MAX LAFONTAN 2005; YAMADA & KATAGIRI 2007; TCHERNOF 2007). Neste contexto, muitos estudos vêm relacionando a eficiência da prática de exercício físico no combate e prevenção destas doenças. ENEVOLDSEN *et al.*, (2000), KIM *et al.*, (2000) FUERGER, *et al.*, (2004) e ROPELLE *et al.*, (2006) descreveram diferentes protocolos de atividade física, em ratos, com o objetivo principal de analisar a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. FUERGER *et al.*, (2004) descreveram a eficiência da corrida em intensidade

moderada, durante 30 minutos; ENEVOLDSEN *et al.*, (2000) preferiram o treino de natação com duração crescente chegando ao máximo de 6 h em 10 semanas; KIM *et al.*, (2000) optou pelo treino de natação de 3 h por dia durante 3 semanas; ROPELLE *et al.*, (2006) utilizaram o treino de natação em um único dia com 2 sessões de 3 h e intervalo de 45 minutos entre cada sessão. Em todos os protocolos relatados houve melhora na captação periférica de glicose. Segundo o modelo de natação do Laboratório de Estudo do Estresse (LABEEST), ratos foram submetidos às sessões diárias de natação, durante 50 minutos em tanque de vidro (39 cm x 19,5 cm x 24 cm; comprimento x largura x altura) com água à temperatura de  $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 5 dias por semana, durante 4 semanas, realizado sempre no período entre 8 e 10 horas. (DIAS, 2002; MOREIRA, 2005).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

a) Avaliar a sensibilidade à insulina em ratos submetidos ao protocolo de natação proposto pelo LABEEST. A sensibilidade à insulina foi estudada através da realização da técnica de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. Uma vez estabelecido que houve aumento na sensibilidade à insulina neste protocolo de natação, nossos próximos objetivos foram:

b) Avaliar a captação de glicose pelo adipócito epididimal através da análise biomolecular da expressão total das proteínas GLUT-4 e AMPK, nos grupos natação e controle.

c) Avaliar a produção de lactato e glicerol, basal e estimulada, em adipócitos isolados do pâncreo adiposo epididimal.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. Albina, Rodentia, Mamalia, S.P.F.), com idade de 4 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP por duas semanas antes do início do tratamento.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, 4 animais cada, sendo fornecido 500 g de dieta padrão a cada 2 dias. A sala era dotada de controle de temperatura, mantida constante ( $22 \pm 2$  °C) e com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas. Durante os experimentos, os ratos foram tratados de acordo com as normas descritas por OLFERT *et al.* (1993), para uso de animais para pesquisa e educação e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia (Protocolo número: 16991; UNICAMP).

#### **3.2 Protocolo de exercício físico**

Os ratos do grupo natação foram submetidos às sessões diárias de natação, durante 50 minutos em tanque de vidro (39 cm x 19,5 cm x 24 cm; comprimento x largura x altura) com água à temperatura de  $34 \pm 2$ °C, 5 dias por semana, durante 4 semanas, realizado sempre no período entre 8 e 10 horas. (DIAS, 2002; MOREIRA, 2005). Após a natação os ratos foram secados com toalha e aquecidos durante 20 minutos com aquecedor antes de retornarem a suas respectivas gaiolas-moradia.

### **3.3 Controle da evolução ponderal e consumo de ração**

Durante as 4 semanas em que os ratos permaneceram sedentários ou foram submetidos à natação, foram avaliados o peso corporal e o consumo de ração. Este controle foi realizado 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), sempre no período entre 12 e 13 horas.

### **3.4 Cateterização dos Vasos Sanguíneos**

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (Cloridrato de Cetamina, 50 mg/Kg de peso corporal, i.m.) e Rumpum (Cloridrato de Xilazina 0,01 mg/Kg de peso corporal, i.m.), seguindo protocolo de UENO *et al.*, 2005. Em seguida, após tricotomia e assepsia local, a artéria carótida direita e a veia jugular direita foram cateterizadas com um tubo de polietileno PE10 (siliconizado) conectada a outro tubo de polietileno PE50 (preenchida com 0,9 % NaCl m/v) (POPOVIC & POPOVIC, 1960, De ALMEIDA, 2008).

### **3.5 Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico**

O ensaio do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico é utilizado para determinação do metabolismo glicêmico dos animais e consiste na manutenção de uma taxa de infusão constante para a insulina enquanto que a taxa de infusão de glicose (GIR) deve ser regulada momento a momento. Como o princípio básico do ensaio relaciona-se com a manutenção de uma euglicemia verifica-se, ao final de 2 horas de experimentação, se houve alteração da captação de glicose pelos tecidos periféricos entre os grupos. Entende-se que, em *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, quanto maior a resistência dos tecidos do indivíduo à insulina menor será a taxa de infusão de glicose (GIR) (AGOSTO *et al.*, 1997).

Os ratos tiveram sua veia jugular direita e artéria carótida direita cateterizadas, como descrito acima. Após a cateterização, adotamos dois protocolos diferentes para a realização do experimento *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. O primeiro protocolo (Protocolo *clamp* 2007) realizado em 2007 seguindo a metodologia já padronizada em nosso laboratório (De Almeida, 2008) e consiste na realização do *clamp* 24 horas após o procedimento cirúrgico de cateterização. Neste caso, as cânulas foram exteriorizadas na região dorsal do animal e no dia do ensaio foram implantadas extensões de cateteres para que o animal (em jejum, 16 horas) tivesse liberdade de movimento dentro de sua gaiola. No segundo protocolo (Protocolo *clamp* 2008) realizado em 2008, após o procedimento cirúrgico as cânulas foram expostas na região ventral do animal já que o mesmo permanecia em decúbito dorsal e anestesiado durante todo o experimento do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. Houve um período de aproximadamente 1 h entre a cirurgia e o início do experimento para a recuperação do animal. Nos dois protocolos foi implantado no cateter venoso um T para a perfusão simultânea das seguintes soluções:

- uma solução de insulina de cerca de 6 mU/Kg.min diluída em NaCl 0,9% adicionado de 1% de BSA, com auxílio de uma bomba de infusão em velocidade constante;
- uma solução de glicose (10 %) com auxílio de uma bomba peristáltica. O débito de perfusão em função da velocidade da bomba foi verificado antes de cada *clamp*.

A glicemia foi avaliada em 10  $\mu$ L de plasma através de um analisador de glicose, glicosímetro (ACCU CHEK Go, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O débito de perfusão de glicose foi realizado de tal forma que a glicemia fosse mantida em 6 mM. O tempo de realização do *clamp* foi de 2 horas, sendo a primeira hora para atingir a estabilização das concentrações plasmáticas de insulina e de glicose. Durante todo este período o rato foi mantido sob o efeito da anestesia.

Os resultados foram expressos como a quantidade de glicose perfundida para manter a euglicemia (GIR: mg/Kg.min) durante primeira e segunda hora de *clamp* que foi um índice de utilização total de glicose pelo organismo inteiro (AGOSTO *et al.*, 1997; BARET *et al.*, 2002).

### 3.6 Isolamento de Adipócitos

Adipócitos foram isolados do tecido adiposo epididimal por uma modificação no procedimento original de RODBELL (1964). O tecido adiposo foi pesado (aproximadamente 3 g), picado e digerido em três tubos de polietileno (20 mL), contendo cada um 10 mL de tampão Krebs Ringer bicarbonato, 25 mM HEPES, 6 mM glicose, pH 7,4 (Tampão KRB) com a adição de 1 mg/mL de colagenase (tipo 2, *Clostridium histoliticum*) e 3% albumina sérica bovina (BSA, fração V, livre de ácidos graxos; KRBA). Os tubos foram agitados em 60 ciclos/min a 37°C durante 45 minutos. A suspensão celular resultante foi filtrada através de uma malha de nylon (200 µM) e lavada três vezes com tampão fresco KRBA. Uma alíquota da suspensão celular final foi contada em câmara Mallassez, para ajuste da concentração de células em 100.000 células/mL conforme FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1998.

### 7 Estudo Farmacológico

Uma vez realizada a contagem dos adipócitos, bem como o ajuste do volume para concentração de células em 100.000 células/mL foi iniciada a incubação dos adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal. As células foram incubadas com o agonista não seletivo de adrenoceptor  $\mu$  e  $\mu$ , a noradrenalina e o agonista não seletivo do adrenoceptor  $\beta$ , a isoprenalina, nas concentrações de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M na ausência ou presença do antagonista seletivo do adrenoceptor  $\alpha_1$ , prazosin, na concentração de  $10^{-6}$  M (PAUL *et al.*, 1999).

Para determinação do valor basal de lipólise (glicerol) ou glicólise (lactato), os adipócitos foram incubados, conforme descrito abaixo, na ausência de agonistas ou antagonistas. Foram preparados também, *ependorfs* contendo suspensão celular e solução tampão que foram imediatamente colocados em gelo picado. Os valores de glicerol e lactato obtidos a partir destes ensaios foram utilizados para descontar os valores de lipólise e/ou glicólise decorrentes da manipulação destes tubos, que foram denominados “gelo”. Finalmente alguns adipócitos foram incubados com o antagonista prazosin na concentração descrita acima.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo o volume final dos *ependorfs* acertado para 1 mL. A incubação foi realizada em banho-maria a 37°C durante 60 minutos, sob agitação constante de 60 ciclos/minuto. A colocação da suspensão celular no *ependorf* determinou o início do ensaio.

A reação foi finalizada após esse período colocando as amostras em gelo picado. Após a permanência das células no gelo por 40 minutos, os adipócitos foram retirados do meio de incubação através da aspiração e o infranadante foi imediatamente congelado e armazenado a -20°C para posterior análise da concentração de glicerol e lactato com *kit* apropriado.

### **3.8 Determinação do Lactato no Meio de Incubação**

Para a determinação da concentração de lactato presente no meio de incubação dos adipócitos, foi utilizado *kit* enzimático (Trinity, adaptado por CREGE, 2007).

A reação é a que segue: o ácido láctico, presente nas amostras ou padrão é convertido em piruvato e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela lactato oxidase. Na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado, a peroxidase catalisa a oxidação de um precursor cromogênico que produz a coloração, cuja intensidade é lida no espectrofotômetro.

Da mesma maneira que o experimento para determinar a quantidade de glicerol liberada pelos adipócitos, que será descrita abaixo, inicialmente foi preparada uma curva com concentrações conhecidas de lactato. São preparados sete *ependorfs* contendo diferentes quantidades da solução padrão que acompanha o *kit*, e de KRBA (444  $\mu$  g/ $\mu$  L; 341  $\mu$  g/ $\mu$  L; 296  $\mu$  g/ $\mu$  L; 222  $\mu$  g/ $\mu$  L; 148  $\mu$  g/ $\mu$  L; 74  $\mu$  g/ $\mu$  L e 37  $\mu$  g/ $\mu$  L). Também é considerado um ponto zero para a curva, que contém apenas KRBA.

Para análise da quantidade de lactato liberada pelos adipócitos utilizamos uma placa de Elisa, e nos *wells* pipetamos alíquotas de 10  $\mu$  L para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10  $\mu$  L de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10  $\mu$  L da amostra de cada *ependorf* do ensaio funcional. Em seguida, foram adicionados 90  $\mu$  L do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C, e para prevenir a degradação do lactato pela ação luminosa, a placa foi envolvida em papel alumínio. Após a incubação, foi realizada a leitura da concentração de lactato através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm.

### **3.9 Determinação do Glicerol no Meio de Incubação**

O índice de lipólise foi avaliado pela quantidade de glicerol produzida no meio de incubação. Este glicerol, presente no meio de incubação foi quantificado por meio de reações catalisadas pelas enzimas glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase (*kit* de triglicerídeos da Laborlab, SP, Brasil, adaptado CREGE, 2007).

A fosforilação do glicerol em glicerol-1-fosfato é catalisada pela enzima glicerol quinase. O glicerol-1-fosfato é então oxidado pela glicerol fosfato oxidase em fosfato de diidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A coloração é então produzida pela reação catalisada pela peroxidase.

Antes de iniciar o experimento foram feitas curvas com concentração conhecida de glicerol. Foram preparados cinco *ependorfs* contendo a solução padrão de glicerol e tampão KRBA e um *ependorf* contendo apenas tampão KRBA, que chamamos de “zero”. As concentrações conhecidas foram 5  $\mu$ g/200 mL (5 mL da solução padrão + 195 mL de KRBA), 10  $\mu$ g/200 mL (10 mL da solução padrão + 190 mL de KRBA), 20  $\mu$ g/200 mL (20 mL da solução padrão + 180 mL de KRBA) 25  $\mu$ g/200 mL (25 mL da solução padrão + 175 mL de KRBA) e 50  $\mu$ g/200 mL (50 mL da solução padrão + 150 mL de KRBA), que compreendia o valor da liberação de glicerol em adipócitos.

Para análise da quantidade de glicerol liberada foi utilizada uma placa de Elisa, e nos *wells* foram pipetadas alíquotas de 10  $\mu$  L para cada concentração da curva descrita acima (triplicata de cada concentração), 10  $\mu$  L de água mili Q em três *wells*, que foi utilizada para zerar o leitor de Elisa, e 10  $\mu$  L da amostra de cada *ependorf* do ensaio funcional. Em seguida, foi adicionado 50  $\mu$  L do reativo de trabalho do *kit* em todos os *wells*, menos nos que continham apenas água.

A placa foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Transcorrido este tempo a reação foi parada adicionando-se 50 mL de água mili Q gelada em todos os *wells* e, imediatamente após a adição da água, foi realizada a leitura da concentração de glicerol através de um leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm.

A concentração de glicerol no meio de incubação foi expressa em  $\mu$  mol de glicerol em  $10^6$  células/60 minutos (FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1996).

### **3.10 Identificação e quantificação protéica por “Western Blot”**

A expressão total das proteínas GLUT-4 e AMPK foram avaliadas pela técnica de “Western blot”. Os adipócitos foram homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15.000 g a 4 °C por 45 min para

remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Depois da corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-GLUT 4 e anti-AMPK na diluição 2 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology), por 4 hs. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Sigma) por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

### 3.11 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias  $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média), a partir de valores individuais. Os resultados foram analisados através de teste *t* de Student utilizando para tais análises o *software* Prisma (Graphpad Software Inc., USA).

As áreas sob as curvas (AUC) obtidas no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foram realizadas pelo método trapezóide através do *software* Prisma (GraphPad Software Inc., USA) e em seguida analisadas utilizando o teste *t* de Student.

A diferença foi considerada significativa quando os valores de *p* foram menores que 5%.

#### 4. RESULTADOS

O protocolo de natação proposto levou, ao longo de 4 semanas, a um menor ganho de peso (g) dos ratos. Enquanto que no início dos ensaios os ratos dos diferentes grupos (Controle e Natação) apresentavam um peso semelhante, ao final de 4 semanas os ratos que nadaram apresentaram peso significativamente menor que aquele do grupo controle (Tabela 1). Quantificamos também a ingestão alimentar e observamos que o consumo médio de ração dos ratos submetidos a 4 semanas de natação foi significativamente menor, quando comparado ao consumo dos ratos do grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1** – Média do consumo de ração e pesos inicial e final de ratos controle e submetidos a natação. Ratos Wistar com seis semanas de idade foram distribuídos em dois grupos: controle (C: n=14) e natação (N: n=14). Ao longo de 4 semanas foi avaliado o consumo de ração diário. Os ratos do grupo natação foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. O peso corporal dos ratos foi medido sempre no mesmo horário no primeiro dia e ao final de 4 semanas.

	Controle	Natação
Média de consumo (g/dia)	23,22 ± 0,20	20,82 ± 0,25 *
Peso inicial (g)	179,2 ± 3,52	173,4 ± 3,83
Peso final (g)	288,4 ± 4,35 #	264,9 ± 6,45 #*

Dados apresentados como média ± EPM, teste t de Student

\* P<0,05 N vs C;

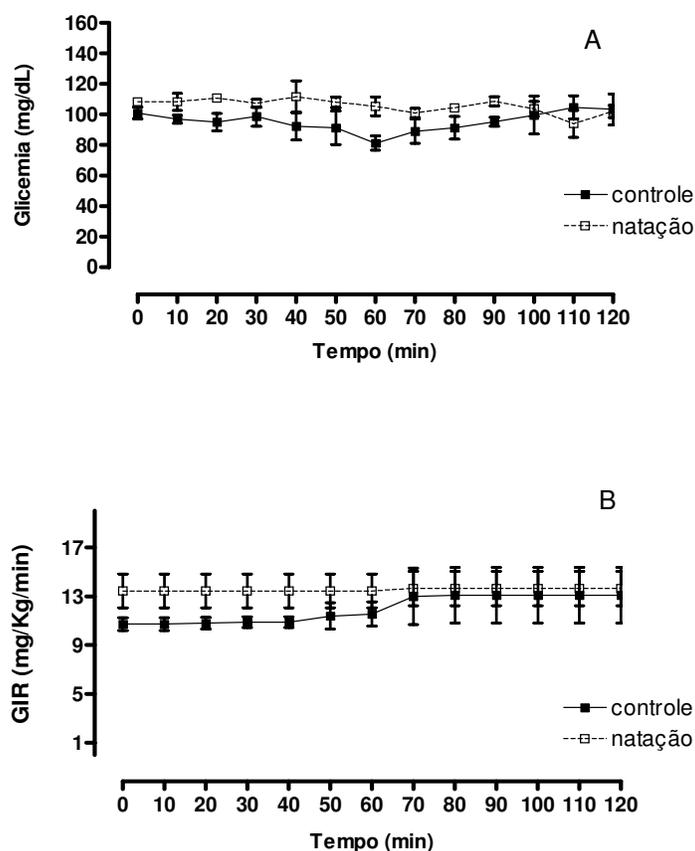
# P<0,05 Peso final vs Peso Inicial.

Quando utilizamos o protocolo de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico já implantado em nosso laboratório (protocolo 2007), ou seja, animal acordado e ensaio realizado 24h após a cateterização, observamos que a taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) dos ratos do grupo natação (N) não diferiu dos ratos do grupo controle (C). Entretanto ao final da realização de todos os ensaios com a utilização deste protocolo, observamos diferença significativa nos valores de glicemia (mg/dL) sendo significativamente mais elevada tanto na segunda hora como ao longo das duas horas do ensaio de *clamp* dos ratos do grupo natação quando comparados aos ratos do grupo controle. Estes resultados indicaram que, durante este ensaio experimental, não foi mantida uma *euglicemia* nos ratos submetido ao protocolo de natação (Tabela 2, Figura 1), sugerindo, portanto que novos ensaios deveriam ser realizados.

**Tabela 2** – Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC, mg/dL) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (protocolo 2007) em ratos controle (C: n=3) ou submetidos a quatro semanas de natação (N: n=3). Os ratos foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados apresentados nesta tabela são decorrentes de ensaios realizados conforme o protocolo 2007 ou seja: 24 horas após a realização da cirurgia de cateterização e com os ratos em jejum por 16 horas foram coletadas amostras sanguíneas e o ensaio de *clamp* foi realizado. As coletas sanguíneas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas na análise. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \* P<0,05 N vs C; teste *t* de Student .

Grupo	1ª hora		2ª hora		Área sob Curva (2 horas)	
	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR
C	93,8 $\pm$ 4,5	11,1 $\pm$ 0,7	94,9 $\pm$ 1,7	12,9 $\pm$ 2,1	11380 $\pm$ 269,2	1440 $\pm$ 174,0
N	108,5 $\pm$ 3,6	13,4 $\pm$ 1,3	102,7 $\pm$ 0,9*	13,6 $\pm$ 1,4	12680 $\pm$ 252,7*	1624 $\pm$ 168,1

Glicemia 1º hora controle x natação p = 0,0639



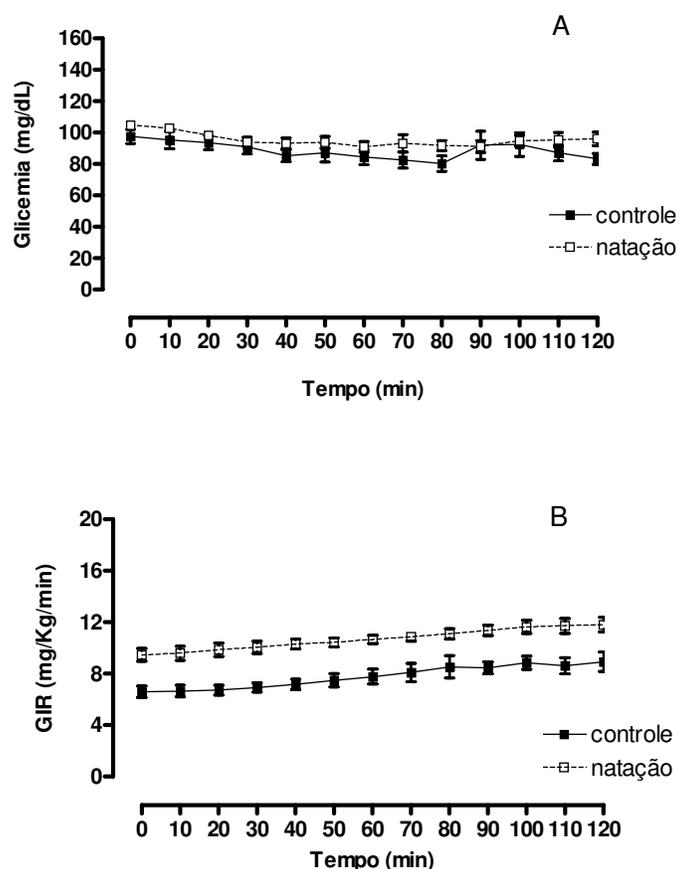
**Figura 1** – Valores glicêmicos (A, mg/dL) e taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos controle (n=3) ou submetidos a quatro semanas de natação (n=3). Os ratos foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vzs por semana durante 4 sem. Os resultados apresentados nestes gráficos são decorrentes de ensaios realizados conforme o protocolo 2007 ou seja, 24 horas após a realização da cirurgia e com os ratos em jejum por 16 horas, foram coletadas amostras sanguíneas. As coletas sanguíneas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas na análise da glicemia. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM das coletas de amostras sanguíneas realizadas a cada 10 minutos. \*  $P < 0,05$  N vs C; teste *t* de Student.

Quando utilizamos o Protocolo 2008, a glicemia (mg/dL) manteve-se estável durante as 2 horas de realização do ensaio experimental, indicando a manutenção da *euglicemia* nos grupos controle e natação. Com este protocolo observamos que a taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) manteve-se aumentada nos ratos submetidos ao protocolo de natação durante todo o ensaio experimental de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico quando comparado ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 2 B).

**Tabela 3** – Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva (AUC, mg/dL/120min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (protocolo 2008) em ratos controle (C: n=6) ou submetidos a quatro semanas de natação (N: n=6). Os ratos foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados apresentados nesta tabela são decorrentes de ensaios realizados conforme o protocolo 2008, ou seja: com os ratos em jejum por 16 horas foi realizada a cirurgia de cateterização e 1 hora após a realização da cirurgia foram coletadas amostras sanguíneas. As coletas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  N vs C; teste *t* de Student e AUC.

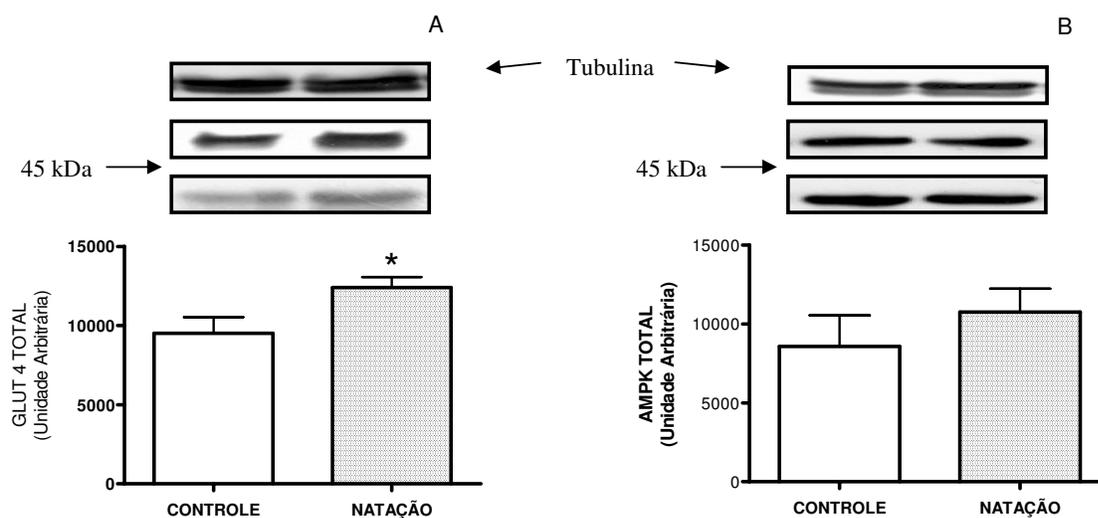
Grupo	1ª hora		2ª hora		Área sob Curva (2 horas)	
	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR	Glicemia	GIR
C	90,5 $\pm$ 4,5	7,0 $\pm$ 0,4	86,0 $\pm$ 4,0	8,46 $\pm$ 0,5	10610 $\pm$ 455,2	509,2 $\pm$ 30,5
N	96,8 $\pm$ 2,3	10,0 $\pm$ 0,4*	93,3 $\pm$ 3,3	11,31 $\pm$ 0,4*	11390 $\pm$ 312,4	679,1 $\pm$ 26,6*

\*  $P < 0,05$  N vs C; teste *t* de Student



**Figura 2** – Valores glicêmicos (A, mg/dL) e valores de taxa de infusão de glicose (B, GIR mg/Kg/min) obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (protocolo 2008) em ratos controle (n=6) ou submetidos a quatro semanas de natação (n=6). Os ratos foram submetidos a sessões de natação, 50 minutos, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados apresentados nestes gráficos são decorrentes de ensaios realizados conforme o protocolo 2008 ou seja: com os ratos em jejum por 16 horas foi realizada a cirurgia de cateterização e 1 hora após a realização da cirurgia foram coletadas amostras sanguíneas. As coletas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM das coletas de amostras sanguíneas realizadas a cada 10 minutos. \*  $P < 0,05$  N vs C; teste *t* de Student.

Durante a realização do ensaio experimental *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, a taxa de infusão de glicose (GIR mg/Kg/min) esteve aumentada nos ratos submetidos a 4 semanas de natação. Assim, tornou-se imprescindível a quantificação da expressão total da proteína GLUT4 essencial para a captação de glicose, em adipócitos de ratos submetidos ou não ao protocolo de natação. O protocolo de quantificação do GLUT4 bem como para a quantificação de AMPK total foi realizado por técnica de “Western Blot”.

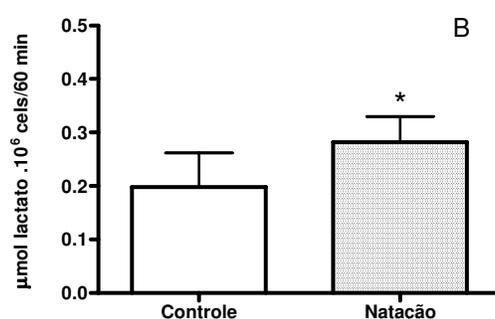
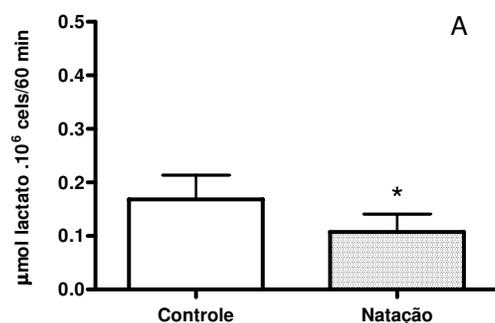


**Figura 3** – Expressão protéica da GLUT 4 total (A) e AMPK total (B) de adipócitos isolados de ratos controle (n=4) e submetidos a 4 semanas de natação (n=4). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados. \*  $P < 0,05$  N vs C; Teste *t* de Student.

Conforme já mencionado acima, a taxa de infusão de glicose (GIR mg/Kg/min) aumentada nos ratos submetidos a natação, analisada através do ensaio experimental *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, nos indica que há maior captação de glicose nos tecidos periféricos destes animais. A confirmação destes dados no animal *in vivo* nos propôs a realizar análises mais detalhadas, *in vitro*, não somente através das análises de biologia molecular, quantificando a expressão total das proteínas GLUT4 e AMPK de adipócitos isolados de ratos controle e exercitado, mas também ensaios funcionais, deste tecido adiposo. Lembrando que a glicose uma vez captada pelo tecido adiposo pode ser fonte para produção de triacilgliceróis ou lactato, uma vez que a quantidade de glicogênio armazenada no tecido adiposo é insignificante. Para tal análise, realizamos ensaios funcionais quantificando a produção de lactato ( $\mu\text{mol}$  lactato,  $10^6$  cels/60 min) e glicerol ( $\mu\text{mol}$  glicerol,  $10^6$  cels/60 min) em adipócitos epididimais isolado de ratos controle e submetidos ao protocolo de natação.

Nos ensaios de adipócitos isolados podemos observar que a fragilidade celular bem como a manipulação das células pode ser avaliada a partir dos dados referentes à produção de lactato na condição “gelo”, imediatamente após o procedimento de isolamento destas células. Nesta condição, a produção de lactato dos adipócitos de ratos exercitados foi significativamente menor que aquela proveniente dos adipócitos isolados de ratos controle (Figura 3 A e C). Isto sugere que os adipócitos isolados dos ratos exercitados apresentam menor fragilidade celular, pois houve menor produção de lactato ( $\mu\text{mol}$  lactato. $10^6$  cels/60 min) comparado ao grupo controle (C).

Por outro lado, a produção basal de lactato foi maior no grupo submetido ao protocolo de natação, comparado ao grupo controle, sugerindo que o aumento da glicose captada pelos adipócitos do grupo submetido ao protocolo de natação pode estar sendo convertida a lactato uma vez que este tecido não armazena a glicose na forma de glicogênio.

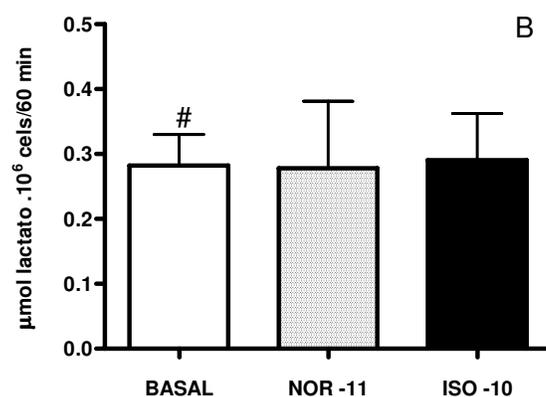
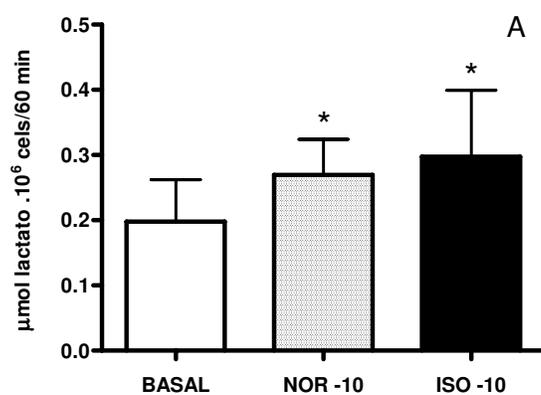


C

	CONTROLE	NATAÇÃO
<b>GELO</b>	0,1683 ± 0,0452	0,1074 ± 0,0334 *
<b>BASAL</b>	0,1977 ± 0,0640	0,2818 ± 0,0454 * #

**Figura 4** – Produção de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) gelo (A e C) e basal (B e C) pelos adipócitos epididimal isolados de ratos controle (C:  $n = 9$ ) e submetidos ao protocolo de natação (N:  $n = 10$ ). O protocolo de natação constituía de 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Para determinação do valor basal, os adipócitos foram incubados, na ausência de agonistas ou antagonistas ao longo de 60 min. Foram preparados também, *ependorfs* contendo suspensão celular e solução tampão que foram imediatamente colocados em gelo picado após o término dos processos de digestão e isolamento, que foram denominados “gelo”. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$  N vs C; #  $P < 0,05$  BASAL vs GELO, teste *t* de Student.

Nos ensaios de adipócitos isolados de ratos controle a concentração de agonista que produziu a resposta máxima de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) foi de  $10^{-10} \text{ M}$  tanto para a noradrenalina (NOR) como para a isoprenalina (ISO) (figura 5 A), enquanto que nos ensaios de adipócitos isolados de ratos submetidos às sessões de natação a concentração do agonista que induziu a resposta máxima foi de  $10^{-11} \text{ M}$  para a NOR e de  $10^{-10} \text{ M}$  para a ISO (figura 5 B). Entretanto, devido ao aumento significativo na produção basal de lactato nos adipócitos isolados do grupo natação não houve estímulo significativo na produção de lactato em adipócitos isolados com os agonistas utilizados. Podemos também observar que a quantidade de lactato basal produzida pelos adipócitos isolados de ratos que praticaram natação não é significativamente diferente daquela induzida por agonistas em adipócitos isolados de ratos controle, ou seja, já na condição basal os adipócitos isolados dos ratos que nadaram apresentaram produção máxima de lactato.

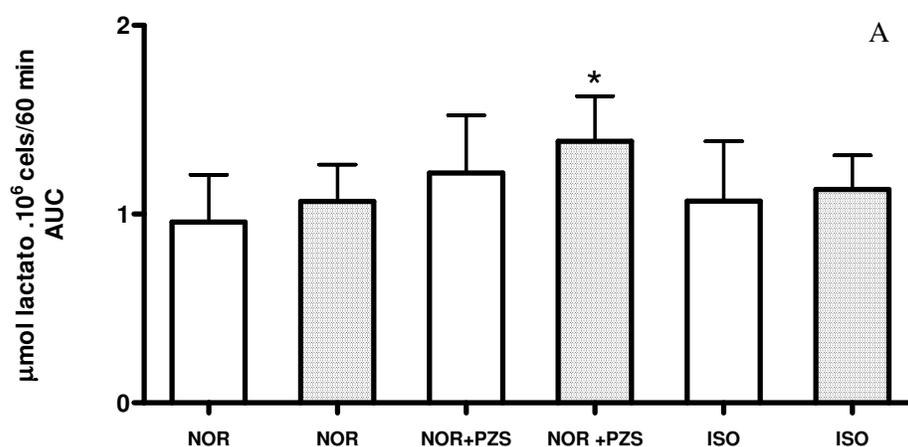


C

	BASAL	NOR -10	NOR -11	ISO -10
<b>CONTROLE</b>	0,1977 ± 0,0640	0,2696 ± 0,0540 *		0,2972 ± 0,1019 *
<b>NATAÇÃO</b>	0,2818 ± 0,0484 #		0,2776 ± 0,1031	0,29,4 ± 0,0719

**Figura 5** – Produção basal (adipócitos incubados na ausência de agonistas ou antagonistas) e produção máxima de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) estimulada por agonistas noradrenalina (NOR) e isoprenalina (ISO) em adipócitos epididimal isolados de ratos controle (A e C) e submetidos às sessões de natação (B e C). O protocolo de natação constituía de 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$  vs BASAL; #  $P < 0,05$  N vs C, teste  $t$  de Student.

A co-incubação de adipócitos epididimais isolados de ratos submetidos ao protocolo de natação com agonista noradrenalina (NOR,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) e antagonista prazosin (PZS,  $10^{-6}$  M) induziu maior produção de lactato ( $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) quando comparado a incubação dos adipócitos apenas na presença do agonista noradrenalina, resultados analisados em AUC.

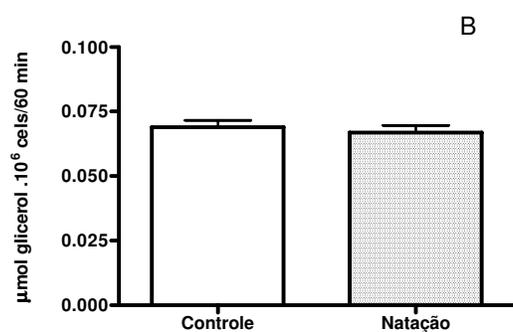
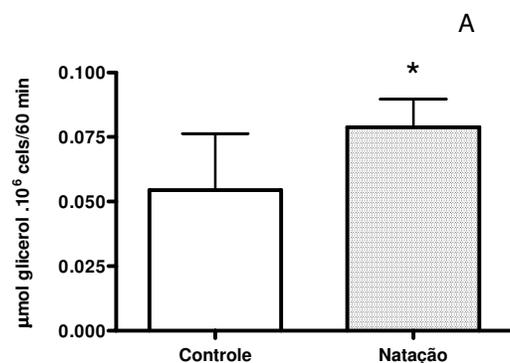


	NOR	NOR + PZS	ISO
<b>CONTROLE</b>	0,9596 ± 0,2490	0,9596 ± 0,2490	1,0690 ± 0,3175
<b>NATAÇÃO</b>	1,0670 ± 0,1954	1,2180 ± 0,3055 *	1,1310 ± 0,1817

**Figura 6** – Produção de lactato, em área sob a curva (AUC,  $\mu\text{mol lactato} \cdot 10^6 \text{ céls}/60 \text{ min}$ ), estimulada por agonistas noradrenalina (NOR,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) e isoprenalina (ISO,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) na presença ou ausência do antagonista prazosin (PZS,  $10^{-6}$  M) em adipócitos isolados de ratos controle ( $\square$ ) e submetidos às sessões de natação ( $\square$ ). Os ratos foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$ , natação = NOR vs NOR + PZS, teste *t* de Student.

Nestes mesmos ensaios de adipócitos também quantificamos a lipólise, através da quantificação de glicerol. Observamos que, diferente da quantificação de lactato na situação “gelo”, o glicerol quantificado no infranadante dos adipócitos isolados de ratos submetidos ao protocolo de natação foi significativamente mais elevada (Figura 7 A e C). Estes resultados dos ensaios “gelo” colocam em dúvida a utilização destes valores apenas para quantificar a fragilidade celular.

Em relação à produção basal de glicerol também os resultados foram distintos em relação aqueles do lactato, ou seja, enquanto, há uma produção de lactato basal significativamente mais elevada dos adipócitos isolados dos ratos submetidos ao protocolo de natação, a produção basal de glicerol não é estatisticamente diferente entre adipócitos isolados dos ratos controle e natação.

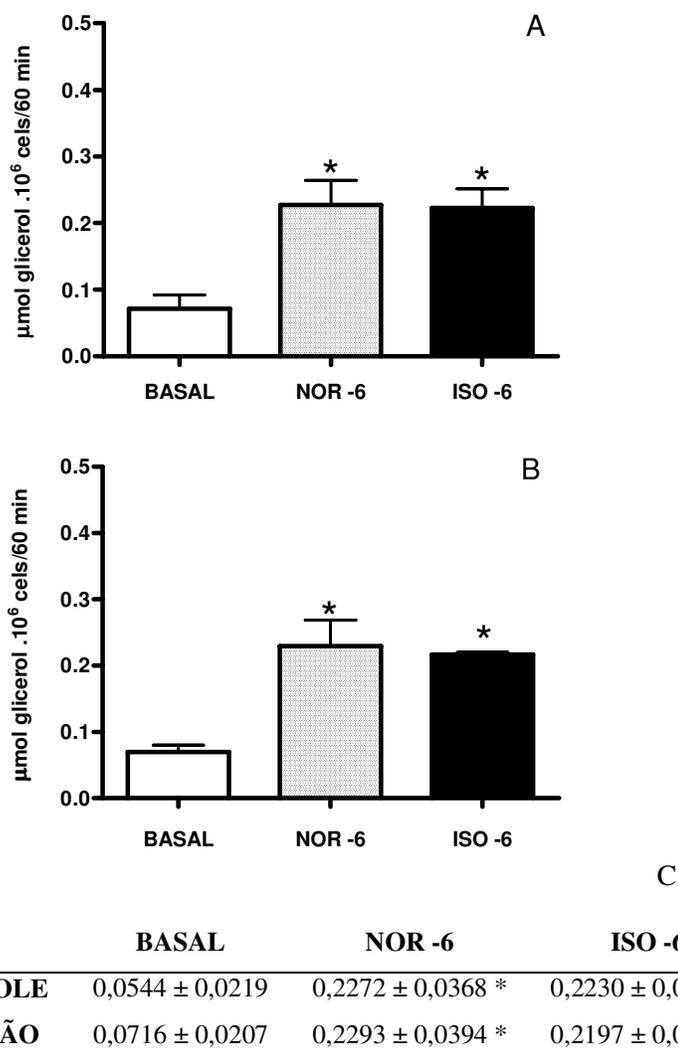


C

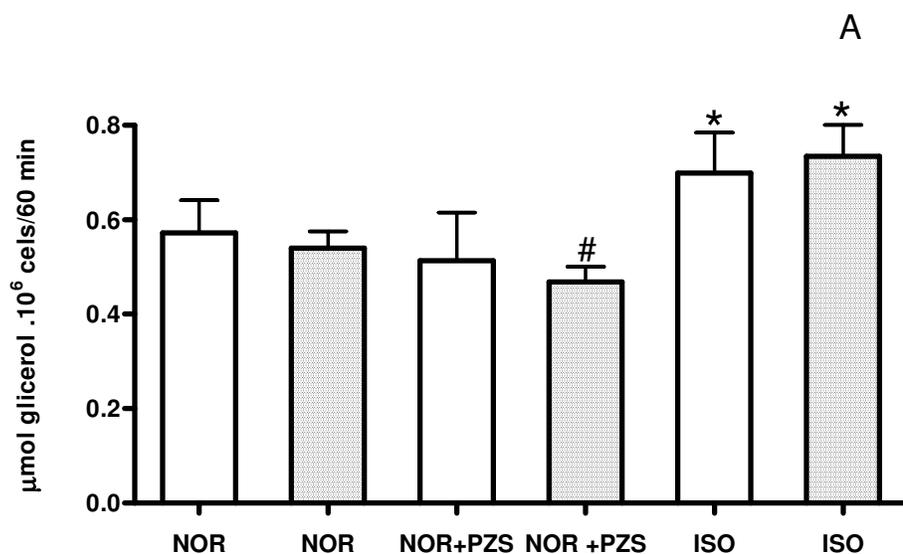
	CONTROLE	NATAÇÃO
<b>GELO</b>	0,0544 ± 0,0219	0,0787 ± 0,0109 *
<b>BASAL</b>	0,0716 ± 0,0207	0,0696 ± 0,0106

**Figura 7** – Produção de glicerol ( $\mu\text{mol glicerol } 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) gelo (A e C) e basal (B e C) pelos adipócitos epididimal isolados de ratos controle (C:  $n = 9$ ) e submetidos ao protocolo de natação (N:  $n = 10$ ). O protocolo de natação constituía de 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Para determinação do valor basal os adipócitos foram incubados, na ausência de agonistas ou antagonistas ao longo de 60 min. Foram preparado também, *ependorfs* contendo suspensão celular e solução tampão que foram imediatamente colocados em gelo picado após o término dos processos de digestão e isolamento, que foram denominados “gelo”. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM em triplicata. \*  $P < 0,05$  N vs C; teste *t* de Student.

Nos ensaios de adipócitos isolados de ratos controle e natação a concentração de agonista que produziu a resposta máxima de glicerol ( $\mu\text{mol glicerol} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) foi de  $10^{-6} \text{ M}$  tanto para a noradrenalina (NOR) como para a isoprenalina (ISO) (figura 8 A, B e C). Entretanto quando os resultados são analisados em AUC podemos observar uma produção de glicerol significativamente mais elevada para o agonista isoprenalina tanto em adipócitos isolados de ratos controle como daqueles submetidos a natação. Nestes ensaios observamos que o antagonista prazosin foi eficaz em inibir a produção de glicerol induzida pela noradrenalina em adipócitos isolados de ratos que nadaram (figura 9 A e B).



**Figura 8** – Produção basal (adipócitos incubados na ausência de agonistas ou antagonistas) e produção máxima de glicerol ( $\mu\text{mol glicerol} \cdot 10^6 \text{ cels}/60 \text{ min}$ ) estimulada por agonistas noradrenalina (NOR) e isoprenalina (ISO) em adipócitos epididimal isolados de ratos controle (A e C) e submetidos às sessões de natação (B e C). O protocolo de natação constituía de 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$  vs BASAL, teste  $t$  de Student.

**B**

	NOR	NOR + PZS	ISO
<b>CONTROLE</b>	0,5723 ± 0,0695	0,5132 ± 0,1023	0,6989 ± 0,0858 *
<b>NATAÇÃO</b>	0,5399 ± 0,0357	0,4681 ± 0,0331 #	0,7350 ± 0,0658 *

**Figura 9** – Produção de glicerol, em área sob a curva (AUC,  $\mu\text{mol glicerol} \cdot 10^6 \text{ céls}/60 \text{ min}$ ), estimulada por agonistas noradrenalina (NOR,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) e isoprenalina (ISO,  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M) na presença ou ausência do antagonista prazosin (PZS,  $10^{-6}$  M) em adipócitos isolados de ratos controle ( $\square$ ) e submetidos às sessões de natação ( $\square$  com pontos). Os ratos foram submetidos a 50 minutos de sessões de natação, 5 vezes por semana durante 4 semanas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$ , NOR vs ISO; #  $P < 0,05$ , NOR vs NOR+PZS, teste *t* de Student.

## 5. DISCUSSÃO

O estilo de vida ocidentalizada, com grande oferta de alimento e baixo gasto energético são os principais fatores responsáveis pelo aumento da prevalência da Síndrome Metabólica, caracterizada por obesidade, Diabetes Mellitus tipo II, hipertensão, doença cardiovascular e dislipidemia (LAFONTAN & BERLAN, 2003; PETERSEN & SHULMAN, 2006).

Uma das características patofisiológicas da Diabetes Mellitus tipo II é a resistência à insulina que ocorre principalmente em tecidos periféricos como músculo (ROPELLE *et al.*, 2006; McGEE & HARGREAVES, 2006) e adiposo (MICHAEL *et al.*, 1993; STALLKNECHT *et al.*, 1993). Na resistência à insulina, há uma maior dificuldade de promover a entrada de glicose na célula, pois o principal transportador desta macromolécula, o GLUT-4, depende principalmente do estímulo da insulina para ser translocado até a membrana plasmática (ENEVOLDSEN *et al.*, 2000; YOUNGREN, 2003; PRADA *et al.*, 2006; McGEE & HARGREAVES, 2006; HOLLAND *et al.*, 2007) A prática do exercício físico se caracteriza benéfica no tratamento desta desordem metabólica, pois promove um aumento na sensibilidade à insulina, principalmente em músculo esquelético, revertendo o quadro de resistência à insulina.

A grande maioria dos estudos, como não poderia deixar de ser, relacionam o exercício físico com a melhora na sensibilidade à insulina nas células da musculatura esquelética, esquecendo que o tecido adiposo também participa da captação de glicose de forma insulino-dependente. Outro fator comum entre os estudos é a preferência em estudar exercícios de média a alta intensidade.

Neste sentido, o estudo em questão tem a finalidade de verificar a relação entre o exercício físico e a captação de glicose mediada por GLUT-4, sendo que, o exercício físico desenvolvido em nosso laboratório foi de baixa intensidade e a célula que nos estudamos foi o adipócito.

Para iniciar nossos estudos, realizamos primeiramente um controle do peso e ingesta alimentar.

### **Peso e Ingesta**

Estudos recentes vêm investigando o balanço energético de indivíduos ou animais de laboratório, com a finalidade de relacionar o peso corporal e a ingesta alimentar na presença ou ausência da prática de exercício físico. A prática do exercício físico promove um gasto energético acentuado que pode ou não ser acompanhado por aumento na ingesta de nutrientes.

O controle de peso e ingesta realizada em ratos Wistar adultos submetidos ou não ao protocolo de natação, indica que durante a prática da natação em intensidade leve (50 minutos, 5 vezes por semana durante 4 semanas), houve menor aumento do peso corporal que foi acompanhado por diminuição na ingesta (tabela 1).

Segundo MEYER *et al.*, 1954 citado em MELZER K, 2005, a aquisição de energia compensatória ao gasto está diretamente relacionada com a intensidade do exercício físico. Ratos sedentários possuem um gasto energético diminuído, o qual não é acompanhado pela redução da ingesta levando ao aumento de peso, enquanto ratos exercitados em intensidade leve (50 minutos de corrida / dia) apresentam um aumento no gasto energético e uma diminuição na ingesta, promovendo decréscimo no peso corporal. O autor ainda conclui que o exercício físico realizado em baixa intensidade é denominado “não responsivo” no que concerne ao consumo de alimento.

KRETSCHMER *et al.*, 2005 descreveram que ratos Wistar (170 – 190g) não apresentaram diferença na quantidade de ração ingerida, mas apresentaram um menor peso corporal (exercício ganhou menos peso) quando submetidos a um protocolo de natação de 6 séries de 2 minutos (total de 12 minutos) durante 5 semanas, indicando que apenas 12 minutos por dia em um período de 5 semanas foram suficientes para diminuir o ganho no peso corporal e acúmulo de gordura.

A diminuição na ingesta no grupo submetido ao protocolo de natação apresentada em nosso estudo pode estar relacionada com uma maior concentração plasmática de glicose, ácidos graxos livres e lactato. Segundo SCHEURINK *et al.*, 1999 durante e após a realização de exercícios de curto período em ratos (2 horas de natação) houve uma maior disponibilidade destes nutrientes diminuindo a ingesta.

Estes resultados indicam que o exercício físico de baixa intensidade promove um aumento na disponibilidade de nutrientes para a célula em decorrência de uma maior mobilização dos nutrientes para a corrente sanguínea, não sendo necessário aumentar a ingesta (MEYER *et al.*, 1954 citado em MELZER K, 2005; SCHEURINK *et al.*, 1999 e KRETSCHMER *et al.*, 2005).

Os resultados da relação peso x ingesta realizados em ratos, apresentaram o mesmo padrão de resposta quando o objeto de estudo foram homens adultos e saudáveis (BLUNDELL & KING, 1988; KING, 1994).

### **Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico**

A técnica do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico tem o objetivo principal de verificar a captação de glicose dos ratos, analisada através da taxa de infusão de glicose.

Nossos resultados iniciais, relacionados ao primeiro protocolo de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (Protocolo *clamp* 2007) mostrou-se não confiável, pois neste procedimento não houve a manutenção da euglicemia, condição rigorosamente necessária para a análise precisa dos dados. Neste primeiro protocolo a técnica do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foi realizada com os ratos acordados, o que pode interferir no resultado devido a um menor controle sobre o experimento (tabela 2).

Assim, adotamos um segundo protocolo experimental do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (Protocolo *clamp* 2008), desta vez o rato permanecia anestesiado durante as duas horas do

procedimento. Os resultados apresentados (tabela 3) nos indicam que os ratos do grupo controle e natação apresentaram euglicemia durante todo o protocolo experimental, com a taxa de infusão de glicose maior nos ratos do grupo natação comparado ao grupo controle. Esta maior taxa de infusão no grupo exercitado comprova que o exercício físico realizado em baixa intensidade (50 minutos de natação, 5 dias/semana durante 4 semanas) também pode promover uma melhora na sensibilidade à insulina em ratos, parecido com exercícios moderados a intenso.

Nossos resultados estão de acordo com estudos encontrados na literatura como, por exemplo, o estudo de KIM *et al.*, 2000 que submeteram ratos Sprague-Dawley adultos a um protocolo de natação de 3h/dia durante 3 semanas e verificaram maior taxa de infusão de glicose comparado ao grupo controle durante o procedimento do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. ROPELLE *et al.*, 2006 realizaram um protocolo de natação de duas sessões de 3h cada com intervalo de 45 minutos e verificaram que ratos obesos (obesidade induzida por dieta hiperlipidêmica) que apresentavam resistência à insulina retornaram a índices semelhantes ao controle após o protocolo de natação. ENEVOLDSEN *et al.*, 2000 demonstraram uma maior captação de glicose em ratos submetidos a um treinamento de natação que foi gradualmente aumentando até um máximo de 6h/dia (5 dias/semana) durante 10 semanas, quando comparado ao controle.

Esta maior sensibilidade à insulina após um período crônico de exercício, está diretamente relacionada com aumento na expressão da proteína transportadora GLUT-4 analisada principalmente na musculatura esquelética (KIM *et al.*, 2000; FUEGER *et al.*, 2004; ROSE & RICHTER, 2005; MCGEE & HARGREAVES, 2006). TERADA *et al.*, 2001, realizou dois protocolos de natação: o primeiro de alta intensidade (8 – 10 séries de 20s de natação, intervalo de 10s e suportando um peso equivalente a 14% do peso corporal durante 8 dias) e outro de baixa intensidade (2 séries de 3h por dia,

intervalo de 45 minutos 6h por dia com peso equivalente a 2% do peso corporal) e demonstrou que ambos aumentaram a expressão de GLUT-4 no músculo esquelético na mesma proporção.

Mas as células musculares não respondem sozinhas ao metabolismo de glicose durante a prática do exercício físico. Hoje nos sabemos que a proteína GLUT-4 é o principal transportador responsável pela captação de glicose em situações de estresse (por exemplo, no exercício físico) também no tecido adiposo.

### **Expressão de GLUT-4**

Como os resultados do procedimento do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico indicam que o protocolo de natação desenvolvido em nosso laboratório (50 minutos de natação, 5 dias/semana durante 4 semanas) promoveu maior captação de glicose no rato *in vivo* quando comparado ao controle, resolvemos quantificar a participação da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimal.

Os resultados corroboram com outros estudos, demonstrando que o tecido adiposo tem uma participação importante na captação de glicose estimulada pela insulina, pois a expressão total de GLUT-4 foi maior em ratos natação comparado ao grupo controle. STALLKNECHT *et al.*, 1993, através da técnica de Northern blot e Western blot, mostraram uma quantidade maior de GLUT-4 mRNA em adipócitos epididimais, comparando grupo controle com exercitado (natação, foi aumentando gradualmente, chegando a um máximo de 6h/dia durante 8 semanas, 5 dias por semana), enquanto HIRSHMAN *et al.*, 1993, obtiveram resultados similares em tecido adiposo parametrial, comparando grupo controle e exercício voluntário durante 6 semanas, mas apenas através da realização da técnica de Western blot.

Os resultados de outros estudos e os nossos resultados comprovam que não apenas o tecido muscular está envolvido na captação de glicose, mas o tecido adiposo epididimal também contribui para o metabolismo de glicose.

Este aumento na captação de glicose no adipócito estimula maior expressão de adipocinas, em especial do hormônio leptina (FRUHBECK *et al.*, 2001). A leptina, conhecida como o principal hormônio anorexigênico, que atua nas células hipotalâmicas diminuindo a fome (YAMADA & KATAGIRI, 2007) pode estar envolvida na regulação metabólica, atuando como um sensor dos níveis de nutrientes do sangue (FRUHBECK *et al.*, 2001). Este fato fortalece a tese de que o adipócito não é apenas uma célula de reserva de energia, mas participa de maneira ativa no controle do metabolismo energético.

Outro dado importante que podemos afirmar, é que o exercício de baixa intensidade promove benefícios semelhantes ao exercício de média e alta intensidade quando analisamos a expressão da proteína GLUT-4 e a captação de glicose.

O aumento na expressão de GLUT-4 em tecido muscular, pode estar relacionado com 2 candidatos principais: fatores neurotróficos e AMPK (TERADA *et al.*, 2001). A ação dos fatores neurotróficos está diretamente relacionada com a intensidade do exercício, mas, mesmo em intensidade baixa de exercício, há liberação suficiente de fatores neurotróficos para promover maior expressão da proteína transportadora de glicose (MEGENEY *et al.*, 1994).

### **Expressão de AMPK**

A proteína kinase dependente de AMP é um sensor de energia intracelular, está diretamente relacionada com o metabolismo celular e vem sendo muito estudada no processo de captação de glicose

relacionada ao exercício físico. Ainda não se sabe ao certo como esta proteína desencadeia seu estímulo para maior produção de GLUT-4, mas há evidências de que participe diretamente deste processo.

Hoje, sabemos que a via da AMPK se assemelha à via da insulina ao estimular a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (HARDIE, 2003; TOWLER & HARDIE, 2007). A diferença entre estes dois mecanismos está no caminho percorrido pela glicose. Enquanto a insulina estimula a formação de glicogênio a partir da glicose (reação anabólica), a AMPK estimula a glicólise e a oxidação desta glicose (reação catabólica) (HARDIE, 2003; TOWLER & HARDIE, 2007).

Esta enzima está principalmente envolvida na manutenção da homeostase energética da célula, sendo ativada quando há um incremento na proporção AMP:ATP, em decorrência principalmente do aumento no consumo de ATP (HARDIE, 2003; HARDIE & SAKAMOTO, 2006; TOWLER & HARDIE, 2007). Assim, este processo catabólico, ativado pela AMPK, promove a formação de novas moléculas de ATP restabelecendo a razão AMP:ATP e preparando o músculo para o exercício subsequente (HARDIE, 2003).

FROSIG *et al.*, 2004 demonstraram que em tecido muscular de indivíduos que realizaram 3 semanas de treinamento físico, houve aumento na expressão total da proteína AMPK. Outros estudos demonstraram que não houve aumento na expressão total da proteína AMPK em tecido adiposo epididimal de ratos após a realização de exercício agudo e crônico (6 semanas de corrida), mas houve aumento na atividade desta proteína (KOH *et al.*, 2007). Em nosso protocolo de natação, a expressão total desta proteína foi numericamente maior quando comparada aos valores obtidos do grupo sedentário sem, portanto ser significativamente diferente. Este resultado sugere que a proteína AMPK sofre regulação aguda, sendo que a análise de sua expressão total realizada após 3 dias do período de natação, foi suficiente para que a quantidade desta proteína kinase retornasse a níveis semelhantes ao basal.

### **Glicose captada como fonte para a glicólise ou lipogênese?**

Com o objetivo de verificar se a glicose captada pelo adipócito epididimal seria fonte para a produção de lactato (glicólise) ou de ácidos graxos (lipogênese), investigamos a produção basal e estimulada tanto de lactato como de glicerol.

A insulina tem vários efeitos que levam ao armazenamento de gordura no tecido adiposo. Este hormônio aumenta a utilização de glicose pela maioria dos tecidos do organismo, o que automaticamente diminui a utilização da gordura, funcionando assim como um “poupador de gordura”. A insulina também promove a síntese de ácidos graxos, principalmente quando são ingeridos mais carboidratos do que podem ser usados para a utilização imediata, fornecendo assim o substrato para a síntese de gordura. Quase toda a síntese de lipídeos insulino-dependente ocorre no fígado, e os ácidos graxos são então transportados do fígado por meio da VLDL para ser estocado nas células adiposas.

Neste modelo de natação proposto verificamos que a captação de glicose pelos adipócitos está aumentada, efetivamente pelo aumento da sensibilidade periférica à insulina (ensaios de clamp) bem como pelo aumento na expressão de GLUT-4. A glicose captada por estas células tem três caminhos a percorrer:

1- Formação de glicogênio - a quantidade de glicogênio formada é considerada insignificante, sendo menos de 2-3% da glicose metabolizada (DIGIROLAMO *et al.*, 1992).

2- Formação de lactato - a glicose captada pelo tecido adiposo é metabolizada dando origem ao lactato (FAINTRENIE & GÉLOËN, 1995). O lactato produzido é transportado para a corrente sanguínea, uma vez que as células adiposas apresentam transportadores de monocarboxilato (MCT's), como ocorre nas células do tecido muscular esquelético (HAJDUCH *et al.*, 2000).

3- Formação de ácidos graxos - a glicose sofre glicólise gerando piruvato, o qual subseqüentemente é convertido a acetil-coenzima A (acetil-CoA), o substrato a partir do qual os ácidos graxos são sintetizados contribuindo assim para a lipogênese (SALTIEL & KAHN, 2001).

Destes substratos energéticos avaliamos a produção tanto de lactato como de glicerol pelos adipócitos isolados.

Em relação à quantificação de lactato observamos um aumento significativo na produção basal de lactato sem, portanto, ter alteração na produção estimulada pelos agonistas utilizados. O tecido adiposo foi descrito como um importante sítio para a produção de lactato, principalmente em situação de jejum (JANSSON *et al.*, 1994). Durante o período de jejum, o lactato é um importante precursor gliconeogênico (DIGIROLAMO *et al.*, 1992), sendo liberado na circulação e chegando até o fígado, onde passa por uma série de reações (Ciclo de Cori) até ser convertido em nova glicose (SALTIEL & KAHN, 2001). Este ciclo contribui para a manutenção da glicemia.

Estudos anteriores em nosso laboratório utilizando a natação associada à temperatura da água como fonte de estresse, demonstramos que os ratos após esta atividade apresentavam lactatemia associada a um aumento na produção basal de lactato pelos adipócitos. Da mesma forma que neste trabalho, HATORE, 2006 observou que não houve diferença na liberação de lactato estimulada por noradrenalina ou adrenalina.

Analisando a produção de glicerol observada em nossos ensaios podemos sugerir que provavelmente a via lipogênica não está alterada. Não observamos nem alteração na produção basal de glicerol e tampouco na produção estimulada pelos agonistas utilizados.

Em estudos anteriores em nosso laboratório observamos que na maioria dos modelos de estresse utilizado, choques nas patas e natação, a produção basal de glicerol foi significativamente mais elevada comparada a condições controle e houve também diferença significativa na produção de glicerol

induzida pelos agonistas em relação aos adipócitos dos ratos controle (FARIAS-SILVA *et al.* 1999; BARROS, 2003; HATORE, 2006).

No modelo de natação proposto nesta presente tese objetivamos o estudo da sensibilidade periférica à insulina para utilizar este modelo como terapia alternativa para melhora do quadro de doenças metabólicas. Os resultados obtidos nos sugerem fortemente que o modelo proposto leva a um aumento na sensibilidade à insulina que provavelmente será muito eficaz como método para reversão do quadro de resistência à insulina.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho nos propusemos a avaliar a sensibilidade à insulina neste modelo de natação implantado e estudado no Labeest desde 2002 e podemos concluir que:

- Os ratos submetidos a este protocolo apresentam um aumento significativo na captação periférica de glicose, demonstrado pelo aumento na sensibilidade periférica à insulina medida no ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico;

- Os adipócitos isolados apresentaram um aumento na captação de glicose devido ao aumento significativo na expressão total da proteína GLUT-4;

- A glicose captada pelo tecido adiposo está sendo direcionada principalmente para a produção de lactato, contribuindo assim para a manutenção da glicemia destes ratos uma vez que a sensibilidade à insulina está significativamente elevada.

Ao final deste trabalho podemos sugerir que este modelo de natação pode ser usado como método para aumentar a sensibilidade à insulina em tecido adiposo em modelo de resistência à insulina.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGOSTO E, CIMMINO M, MINAIRE Y & GELOEN A. Short-term cold-exposure does not improve insulin sensitivity in rats. **Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.** 1997;117 (2):231-8.

ALESSI DR *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositides-dependent protein kinase which phosphorylates and activate protein kinase B alfa. **Curr. Biol.** 1997;7:261-9.

ARNER P. Adrenergic receptor function in fat cells. **Am. J. Clin. Nutr.** 1992;55:228S-36S.

BALY DL & HORUK R. The biology and biochemistry of the glucose transporter. **Biochem. Biophys. Acta.** 1988; 947:571-590.

BARET G, PEYRONNET J, GRASSI-KASSISSE DM, DALMAZ Y, WIERNSPERGER N & GELOEN A. Increased intraabdominal adipose tissue mass in fructose fed rats: correction by metformin. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.** 2002;110 (6):298-303.

BARROS MMS. Efeito da duração, repetição e intensidade do estresse sobre indicadores metabólicos em ratos. Campinas, 2003. **Dissertação de mestrado** - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

BERGGREN JR, HULVER MH & HOUMARD JA. Fat as an endocrine organ: influence of exercise. **J. Appl. Physiol.** 2005;99:757-764.

BELL GL *et al.* Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care.** 1990;13: 198-208.

BIRNBAUM MJ. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. **Cell** 1989;57:305-315.

BLUNDELL JE & KING NA. Effects of exercise on appetite control: loose coupling between energy expenditure and energy intake. **Int J Obes Relat Metab Disord.** 1988;22(Suppl. 2):S22-9.

BRYANT NJ, GOVERS R & JAMES DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT 4. **Molecular Cell Biology.** 2002;3:267-277.

CHEATHAM B & KAHN CR. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.** 1995;16:117-42.

CHENG TJ, LIU IM, YEN ST & CHEN PC. Role of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor in the regulation of glucose uptake into white adipocyte of rats in vitro. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.** 2000;84:140-146.

CHUDEK J & WIECEK A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. **Pharmacological Reports.** 2006;57:81-88.

CINTI S. The adipose organ. **Prostaglandins, leukotrienes, and Essential Fatty Acids.** 2005;73:9-15.

CRANDALL DL & DIGIROLAMO M. Hemodynamic and metabolic correlates in adipose tissue: pathophysiological considerations. **FASEB J.** 1990;4:141-147.

CREGE DRX. O. Implantação da técnica de estudo funcional de adipócitos isolados de tecido adiposo visceral de humanos eutróficos e quantificação da produção de lactato. Campinas, 2007. **Dissertação de mestrado** - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

FROSIG C, JORGENSEN SB, HARDIE DG, RICHTER EA & WOJTASZEWSKI JFP. 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2004;286:411-417.

CZECH MP & CORVERA S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **The Journal of Biological Chemistry**. 1999;274:1865-1868.

DAVAL M, FOUFELLE F & FERRÉ P. Function of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. **J. of Physiol**. 2006;574:55-62.

De ALMEIDA J. Captação periférica de glicose em modelo de estresse induzido por choque nas patas. Campinas, 2008. **Dissertação de doutorado** - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

DIAS RG, WOLF-NUNES V, MIOTTO AM, SPADARI-BRATFISCH RC & GRASSI-KASSISSE DM. O exercício físico na prevenção das dislipidemias induzida pela dieta em ratos (Resultados Parciais). **In: Congresso Internacional GSSI de Ciências do Esporte**, 2002, São Paulo. 2 Congresso Internacional de Ciências do Esporte, 2002.

DIAS RG, WOLF-NUNES V, MIOTTO AM, ZOPPI RC, SPADARI-BRATFISCH RC & GRASSI-KASSISSE DM. . O exercício físico na prevenção das dislipidemias induzida pela dieta em ratos. **In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FESBE**, 2002, Salvador/BA. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002.

DIAS RG & GRASSI-KASSISSE DM. Efeito preventivo do exercício físico nas concentrações séicas de lipídeos em ratos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica. **In: Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp**, 2002, Campinas. X Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2002

DIGIROLAMO M, NEWBY FD & LOVEJOY J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. **FASEB J**. 1992;6:2405-2412.

DOBBINS RL, SZCZEPANIAK LS, BENTLEY B, ESSER V, MYHILL J & McGARRY JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. **Diabete**. 2001;50:123-130.

DUCLUZEAU PH *et al*. Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. **Diabetes Metab (Paris)**. 2002 ;28 :85-92.

ENEVOLDSEN LH, STALLKNECHT B, FLUCKEY JD & GALBO H. Effect of exercise training on in vivo insulin-stimulated glucose uptake in intra-abdominal adipose in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. 2000 ;278 :E25-E34.

ENEVOLDSEN LH *et al*. The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. **J. of Physiol**. 2001;536 (3):871-877.

- FAINTRENIE G & GÉLOEN A. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. **J Pharmacol Exp Ther** 1995; 277 (1): 235 - 238.
- FAINTRENIE G & GÉLOEN A. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1996a;277:235-328.
- FAINTRENIE G & GÉLOEN A. Lactate production by white adipocytes in relation to insulin sensitivity. **Am. J. Physiol.**, 1996b;270(**Cell Physiol.** 39):C1061-C1066.
- FAINTRENIE G & GÉLOEN A. Alpha-1 adrenergic stimulation uptake in white adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1998;286:607-610.
- FARIAS-SILVA E *et al.* Stress-induced alteration in the lipolytic response to  $\beta$ -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. **J. Lip. Res.** 1999; 40(9): 1719-1727.
- FUEGER PT *et al.* Control of exercise-stimulated muscle glucose uptake by GLUT4 is dependent on glucose phosphorylation capacity in the conscious mouse. **The Journal of Biology Chemistry**, 2004;279:50956-50961.
- FRUHBECK G, AMBROSI JG, MURUZÁBAL FJ & BURREL MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2001;280:E827-E847.
- FRØSIG C, JØRGENSEN SB, HARDIE DG, RICHTER EA & WOJTASZEWSKI JFP. 5<sub>o</sub>-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2004; 286: 411-417,.
- GRAY SL & VIDAL-PUIG AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Nutrition Reviews** 2007;65(6):S7-S12.
- GUYTON & HALL. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças, 10<sup>o</sup> ed, Guanabara Koogan, 2007.**
- HAJDUCH E, HEYES RR, WATT PW & HUNDAL HS. Lactate transport in rat adipocyte: identification of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its modulation during streptozotocin-induced diabetes. **FEBS Letters** 2000; 479: 89 - 92.
- HARDIE DG. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. **Endocrinology**. 2003;144 (12):5179-5183.
- HARDIE DG & SAKAMOTO K. AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. **Physiology**, 2006;21:48-60.
- HATORE ET, SAMPAIO-BARROS MM, FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM & SPADARI-BRATFISCH RC. Adipocytes sensitivity to catecholamines is independent of stress intensity. **In:Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FESBE**, 2006, Águas de Lindóia/SP. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
- HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ, HORTON ED, WARDZALA LJ & HORTON ES. Exercise training increases GLUT4 protein in rat adipose cells. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 1993;264(27):E882-E889.

- HOGAN P, DALL T & NIKOLOV P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. **Diabetes Care.** 2003;26:917-932.
- HOLLAND WL *et al.* Lipid mediators of insulin resistance. **Nutrition Reviews** 2007;65(6):S39-S46.
- HUANG S & CZECH M. The GLUT 4 glucose transporter. **Cell Metabolism.** 2007;5:237-252.
- JAMES DE, STRUBE M & MUECKLER M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. **Nature.** 1989;338:83-87.
- JANSSON PA, LARSSON A, SMITH U & LÖNNROTH P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. **J. Clin. Invest.** 1994; 93: 240-246.
- JENSEN MD. Lipolysis: Contribution from regional fat. **Annu. Rev. Nutr.** 1997;17:127-39.
- KAHN BB. Dietary regulation of glucose transporter gene expression: Tissue specific effects in adipose cells and muscle. **J. Nutr.** 1994;24:12898-12958.
- KHAN AH & PESSIN JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia** 2002;45:1475-1483.
- KIM CH *et al.* Effecto of high fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2000;278:977-984.
- KING NA, BURLEY VJ & BLUNDELL JE. Exercise-induced suppression of appetite: effects on food intake and implications for energy balance. **Eur J Clin Nutr.** 1994;48:715-24.
- KITAMURA T *et al.* Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. **Mol. Cell. Biol.** 1999;19:6286-96.
- KOH HJ, HIRSHMAN MF, HUAMEI HE, YANGFENG LI, MANABE Y, BALSCHI JA. & GOODYEAR LJ Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. **Biochem. J.** 2007; 403:473-481.
- KRETSCHMER BD *et al.* Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences.** 2005;76:1553-1573.
- LAFONTAN M & BERLAN M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J. Lipid. Res.** 1993;34:1057-1091.
- LAFONTAN M & BERLAN M. Fat cell  $\alpha_2$ -adrenoceptor: The regulation of fat cell function and lipolysis. **Endocrine Reviews** 1995;16(6):716-738.
- LAFONTAN M & BERLAN M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? **TRENDS in Pharmacological Sciences.** 2003; 24(6): 276-283.
- LAFONTAN M. Fat cells: Afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2005;45:119-146.

LANGIN D, HOLM C & LAFONTAN M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. **Proceeding of the Nutrition Society**, 1996;55:93-106.

LANGIN D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, 2006;53:482-491.

LATARD MF *et al.* A single bout of exercise induces  $\beta$ -adrenergic desensitization in human adipose tissue. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol.** 2001;280:R166-R173.

LAVIOLA L, PERRINI S, CIGNARELLI A & GIORGINO F. Insulin signaling in human adipose tissue. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 2006;112(2):82-88.

LAWRENCE JC Jr *et al.* GLUT4 facilitates insulin stimulation and camp-mediated inhibition of glucose transport. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1992;89:3493-3497.

MAYER J, MARSHALL NB, VITALE JJ, CHRISTENSEN JH, MASHAYEKHI MB & STARE FJ. Exercise, food intake and body weight in normal rats and genetically obese adult mice. **Am J Physiol.** 1954;177(3):544-8. *Citado em:* MELZER K, KAYSER B, SARIS WHM., PICHARD C. Effects of physical activity on food intake. **Clinical Nutrition.** 2005; 24: 885-895.

McGARRY JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes.** 2002;51:7-18.

McGEE SL & HARGREAVES M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology.* 2006; 33: 395-399.

MEGENEY LA, PRASAD MA, TAN MH & BONEN A. Expression of the insulin-regulatable transporter GLUT-4 in muscle is influenced by neurogenic factors. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 1994;266:E813-E816.

MEYTS P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. **BioEssay**, 2004;26:1351-1362.

MINER JL. The adipocyte as an endocrine cell. **J. Anim. Sci.** 2004;82:935-941.

MOREIRA MF. Sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos normo ou hiperlipidêmicos sedentários ou submetidos a natação. Campinas, 2005. **Dissertação de mestrado** - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.** 1994;219:713-725.

OLFERT BM, CROSS AA & WILLIAM MC. Guide to the Care and Use of experimental animals. **Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario**, 1993;213.

PAUL P, [LAHAYE C](#), [DELAGRANGE P](#), [NICOLAS JP](#), [CANET E](#) & [BOUTIN JA](#). Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1999;290(1):334-340.

PETERSEN KF & SHULMAN GI. Etiology of insulin resistance. **The American Journal of medicine**, 2006;119(5A):10S-16S.

- PETERSON RT & SCHREIBER SL. kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. **Curr. Biol.** 1999;9:R521-R524.
- POPOVIC V & POPOVIC P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. **J. Appl. Physiol.** 1960;15:727-728.
- PRADA PO *et al.* Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. **FEBS Letters.** 2006;580:4889-4894.
- QVISTH V *et al.* Major differences in noradrenaline action on lipolysis and blood flow rates in skeletal muscle and adipose tissue *in vivo*. **Diabetologia**, 2005;48:946-953.
- QVISTH V, HAGSTROM-TOFT E, ENOKSSON S & BOLINDER J. Catecholamine regulation of local lactate production *in vivo* in skeletal muscle and adipose tissue: Role of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2008;93(1):240-246.
- RIBON V *et al.* A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Mol. Cell. Biol.** 1998;19:872-879.
- RIBON V *et al.* Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 1998;95:14751-14756.
- RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J. Biol. Chem.** 1964;239:375-380.
- ROPELLE ER *et al.* 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. of Physiol.** 2006;577:997-1007.
- ROSE AJ & RICHTER EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: How is it regulated? **Physiology.** 2005;20:260-270.
- SALTIEL AR. & KAHN CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 2001;414:799-806.
- SCHEURINK AJ, AMMAR AA, BENTHEM B, VAN DIJK G & SODERSTEN PA. Exercise and the regulation of energy intake. **Int J Obes Relat Metab Disord.** 1999;23(Suppl. 3):S1-6.
- SILVA EF, KASSISSE DMG, NUNES VW & BRATFISCH RCS. Stress-induced alterations in the lipolytic response to  $\beta$ -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. **Journal of Lipid Research**, 1999;40:1719-1727.
- SILVERMAN M. Structure and function of hexose transporters. **Annu. Rev. Biochem.** 1991;60:757-794.
- SMITH RM *et al.* Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 1991;88:6893-6897.
- SMYTH S & HERON A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nat. Med.** 2006;12:75-80.

STALLKNECHT B *et al.* Effect of physical training on glucose transporter protein and mRNA levels in rat adipocytes. **Am. J. Physiol.** 1993;265(Endocrinol. Metab. 28):E128-E134.

STICH V *et al.* Activation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in SCAT of obese subjects. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.** 2000;279:R499-R504.

STICH V *et al.* Activation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2003;285:E599-E607.

STRALFORS P & BELFRAGE P. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, 1983;258(24):15146-52.

STRELA HFG. Reatividade vascular de anéis de aorta isoladas de ratos normo ou hiperlipidêmicos, sedentários ou submetidos à natação. Campinas, 2007. **Dissertação de mestrado** - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

STUART CA, WEN G, GUSTAFSON WC & THOMPSON EA. Comparison of GLUT 1, GLUT 3, GLUT 4 mRNA and the subcellular distribution of their proteins in normal human muscle. **Metabolism**, 2000;49:1604-1609.

STUART CA, YIN D, HOWELL ME, DYKES RJ, LAFFAN JJ & FERRANDO AA. Hexose transporter mRNA for GLUT 4, GLUT 5 e GLUT 12 predominate in human muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2006;291:E1067-E1073.

STULNIG TM & WALDHAUSL W. 11 $\beta$ -Hidroxyesteroid dehydrogenase type 1 in obesity and type 2 diabetes. **Diabetologia**. 2004;47:1-11.

SUH SH, PAIK IY & JACOBS KA. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. **Mol. Cells**, 2007;23 (3):272-279.

SUKHIJA R, KAKAR P, MEHTA V & MEHTA JL. Enhanced 11 $\beta$ -Hidroxyesteroid dehydrogenase activity, the metabolic syndrome, and systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.** 2006;98:544-548.

SZTAIRYD C & KRAEMER F. Differences in hormone-sensitive lipase expression in white adipose tissue from various anatomic locations of the rat. **Metabolism**. 1994;43(2):241-247.

TCHERNOF A. Visceral adipocytes and the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**. 2007;65(6):S24-29.

TERADA S *et al.* Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol** 2001;90:2019-2024.

TOMAS E *et al.* Metabolic and hormonal interactions between muscle and adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**. 2004;63:381-385.

TOWLER MC & HARDIE DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circ. Res.** 2007;100:328-341.

TUR JA, SERRA-MAJEM L, ROMAGUERA D & PONS A. Profile of overweight and obese people in a Mediterranean region. **Obes. Res.** 2005;13:527-536.

UENO M *et al.* Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. **Diabetologia** 2005;48:506–518.

VINTEN J & GALBO H. Effect of physical training on transporter and metabolism of glucose in adipocytes. **Am. J. Physiol.** 1983;244(**Endocrinol. Metab.** 7):E129-E134.

WATT MJ *et al.*  $\beta$ -adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling. **The FASEB Journal**, 2004;18:1445-1446.

WISSE BE. The inflammatory syndrome: The role of adipose tissue cytokines en metabolic disorders linked to obesity. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2004;15:2792-2800.

YAMADA T & KATAGIRI H. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. **Endocrine Journal**, 2007;54:497-505.

YOUNGREN J. Exercise and the regulation of blood glucose. **Endotext.com** 2003 jan; chapter 25.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "EFEITO DA NATAÇÃO NA SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA EM RATOS<sup>™</sup>":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio/IB/UNICAMP (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_;

(  ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP (Protocolo nº 16991);

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.  
Especificar: \_\_\_\_\_



Aluno: TIAGO CASTRO DE P. MARTINELLI



Orientador: DORA MARIA GRASSI-KASSISSE

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(  ) Deferido ( ) Indeferido



Nome:

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Função:

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP