

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA AKT EM MÚSCULO ESQUELÉTICO E SENSIBILIDADE À INSULINA DE RATOS OBESOS

INFLUENCES OF DIFFERENT PROTOCOLS OF PHYSICAL TRAINING ON THE PHOSPHORYLATION OF AKT PROTEIN IN SKELETAL MUSCLE AND INSULIN SENSITIVITY OF OBESE RATS

Rodolfo Marinho^{*}
Rodrigo Stellzer Gaspar^{**}
Luciana Santos Souza Pauli^{***}
Dennys Esper Cintra^{****}
Eduardo Rochete Ropelle^{*****}
José Rodrigo Pauli^{*****}

RESUMO

O Objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico (TF) sobre a sensibilidade à insulina (SI) e a fosforilação da Akt (p-Akt) no músculo de ratos obesos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle: recebeu dieta padrão (C); Obeso sedentário: recebeu dieta hiperlipídica (DHL) por 12 semanas (OS); Obeso treinado-1: recebeu DHL por 12 semanas e TF sem sobrecarga por 6 semanas (OT-1); Obeso treinado-2: recebeu DHL por 12 semanas e TF por 6 semanas com sobrecarga de 5% da massa corporal (OT -2). O teste de tolerância à insulina foi realizado para estimar a SI. A p-Akt e Akt total no músculo gastrocnêmio foram determinadas por Western Blot. Os resultados apontam que o TF com sobrecarga induziu maior p-Akt, porém não houve diferença na SI se comparado ao TF sem sobrecarga. Como conclusão as diferenças na p-Akt não induziram respostas mais significativas de SI em ratos obesos induzidos por DHL.

Palavras-chave: Treinamento Físico. Obesidade. Sinalização da Insulina.

INTRODUÇÃO

As doenças endócrino-metabólicas têm ganhado cada vez mais importância no âmbito da saúde pública, tendo em vista que, nas últimas décadas, elas atingiram elevados níveis de mortalidade no mundo. Dentre elas, cabe destacar a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (SARVAS; KHAPER; LEES, 2013). Neste contexto, urge a necessidade de se buscar novas estratégias que sejam eficientes em impedir o desenvolvimento destas doenças.

Dentre as ferramentas não farmacológicas de combate a obesidade, o exercício físico tem se destacado como uma estratégia eficaz e de baixo risco à saúde. Diversos estudos, tanto em modelos animais (BRUSS et al., 2005; MARINHO et al., 2012; PAULI et al., 2009b; ROPELLE et al., 2009; ROPELLE et al., 2006), quanto em humanos (DESHMUKH et al., 2006; FROSIG et al., 2007; O'GORMAN et al., 2006) têm demonstrado que a prática regular de exercícios físicos exerce efeitos positivos na prevenção e no tratamento da obesidade e de

* Mestre. Discente do Programa de Ciências da Motricidade, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, Brasil.

** Graduando em Ciências do Esporte da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil.

*** Mestre. Discente do Programa de Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil

**** Doutor. Professor do Curso de Nutrição da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil.

***** Doutor. Professor do Curso de Ciências do Esporte da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil.

suas co-morbididades associadas, incluindo a resistência à insulina (BRUSS et al., 2005; DESHMUKH et al., 2006; FROSIG et al., 2007; MARINHO et al., 2012; O'GORMAN et al., 2006; PAULI et al., 2009a; ROPELLE et al., 2009; ROPELLE et al., 2006). Os efeitos benéficos do exercício físico, embora bem estabelecidos no plano fisiológico, ainda carecem de um entendimento mais ampliado no âmbito biomolecular.

Dentre as vias de sinalização intracelular que tanto o exercício físico agudo como o crônico (treinamento físico) conseguem regular positivamente, destaca-se a via de sinalização da insulina. Deste modo, uma adequada função e transdução do sinal da insulina permite que o organismo tenha um adequado controle da glicemia, da síntese de glicogênio, da síntese e utilização de ácidos graxos e da produção hepática de glicose, colaborando com o estado de saúde tanto de seres humanos (CHRIST-ROBERTS et al., 2004; FROSIG et al., 2007; O'GORMAN et al., 2006) quanto de animais (LUCIANO et al., 2002; MARINHO et al., 2012; PÁDUA et al., 2009; PAULI et al., 2009b; PERES et al., 2005).

A sinalização do hormônio insulina se inicia após sua ligação com seu receptor de membrana plasmática que possui atividade tirosina quinase intrínseca. Assim ao se ligar a subunidade alfa do seu receptor de insulina (porção extracelular) o sinal é disparado para o meio intracelular. Esta ligação promove a ativação do domínio catalítico do receptor da insulina (presente na subunidade beta), desencadeando sua auto-fosforilação em resíduos de tirosina. Ativado, o receptor de insulina provoca a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). Quando fosforilados, estes substratos alteram sua conformação e conseguem se associar a proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3q), ativando-a. Esta proteína, quando ativa, desencadeia a fosforilação das proteínas dependente de quinase, as proteínas PDK1 e PDK2. A PDK1, por sua vez, promove a fosforilação em serina da proteína serina/treonina quinase B (Akt), enquanto a PDK2, provoca a fosforilação em treonina da Akt (KIDO; NAKAE; ACCILI, 2001). Em seguida, no músculo esquelético ocorre aumento da fosforilação do substrato da Akt de 160 kDa (a proteína AS160), esta, por sua vez, aumenta a

translocação de GLUT-4 para a membrana do miócito permitindo o ingresso de glicose para o sarcoplasma (FROSIG et al., 2007).

Estudos mostram que em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica há uma menor atividade de proteínas chaves da via de sinalização da insulina, incluindo a Akt, a qual é acompanhada por alterações metabólicas importantes, incluindo a hiperglicemia e hiperinsulinemia (DA SILVA et al., 2010; LIMA et al., 2009; MARINHO et al., 2012; PAULI et al., 2009a). Portanto, a Akt é considerada uma molécula chave no metabolismo da glicose.

Ao contrário, estudos recentes demonstraram que o exercício físico aeróbio foi capaz de aumentar a atividade da Akt, sendo seus efeitos obtidos independentemente de mudanças na massa adiposa corporal dos animais (LIMA et al., 2009; LUCIANO et al., 2002; MARINHO et al., 2012; MATOS et al., 2010). Tais evidências têm colaborado com um melhor entendimento dos efeitos do exercício físico sobre organismos obesos e resistentes à insulina (condição pré-diabetes). No entanto, o número de estudos relacionados à biologia molecular do exercício é ainda escasso, e informações sobre qual intensidade de exercício é mais eficiente para induzir um aumento na atividade de proteínas chaves da via de sinalização da insulina, com repercussões fisiológicas positivas ao organismo não está bem estabelecido.

Portanto, o principal objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico sobre a fosforilação da proteína Akt em músculo esquelético e sensibilidade à insulina de ratos obesos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização dos animais

Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com os princípios e procedimentos de cuidado com o uso de animais experimentais e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, protocolo nº 2805-1. Foram utilizados vinte e quatro (n=24) ratos *Wistar* com seis semanas de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

(CEMIB), da UNICAMP. Os animais foram alocados em gaiolas coletivas com três animais em cada e receberam água e dois tipos de dieta: ração padrão para roedores (grupo controle) ou dieta hiperlipídica (DHL) durante o período experimental, *ad libitum*. Os detalhes da dieta estão descritos na Tabela 1. Os ratos foram expostos a ciclos claro/escuro de 12 horas em cada período e mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro subgrupos: grupo controle (n=6), que recebeu dieta padrão (C); grupo obeso sedentário (n=6), que recebeu DHL por 12 semanas (OS);

grupo obeso treinado (n=6), que recebeu DHL por 12 semanas e foi submetido a um protocolo de treinamento físico de natação sem sobrecarga nas últimas 6 semanas (OT-1), definido no estudo como um treinamento de intensidade leve; e grupo obeso treinado 2 (n=6), que também recebeu a DHL por 12 semanas e foi submetido a um protocolo de treinamento físico com sobrecarga correspondente a 5% da massa corporal dos animais nas últimas 6 semanas (OT -2), considerado no estudo como treinamento de intensidade moderada.

Tabela 1 - Composição da ração padrão e da dieta hiperlipídica.

Ingredientes	Ração padrão		Dieta hiperlipídica	
	g/kg	Kcal/kg	g/kg	Kcal/kg
Amido de milho (q.s.p.)	398	1590	116	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2.5	-	2.5	-
Total	1000	3948	1000	5358

Onde: g/kg = grama/quilograma; Kcal/kg = caloria/quilograma; q.s.p. = quantidade suficiente para.

Fonte: OS autores.

Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento físico consistiu de natação, o qual foi realizado em tanques cilíndricos de diâmetro interno de 60 cm e 100 cm de profundidade, com temperatura da água mantida em $32 \pm 1^\circ\text{C}$, em grupos de três animais. Antes de iniciar o treinamento, os animais foram adaptados ao meio líquido por 3 dias consecutivos, sendo que nos dois primeiros dias eles ficaram com o nível de água até o tórax, por 10 e 15 minutos. No terceiro dia, os ratos foram colocados nos tanques com o nível de água de treinamento

(80 cm de profundidade), permanecendo por apenas 15 minutos no meio líquido. Em seguida deu-se início ao treinamento físico. Os animais realizaram sessões de exercício de 1 hora, cinco vezes por semana, sem sobrecarga adicional para o grupo OT-1, ou com sobrecarga adicional equivalente a 5% da massa corporal dos animais para o grupo OT-2, corrigida em cada semana, presa à cauda do animal. O protocolo mencionado tem sido previamente utilizado em nossos estudos (OLIVEIRA et al., 2011; PAULI et al., 2009a). O treinamento físico teve duração de seis semanas.

Os animais do grupo controle e OS foram colocados em meio líquido por 10 minutos, com água no nível do tórax, duas vezes por semana, para simular o estresse do meio líquido.

Avaliação dos parâmetros metabólicos

A massa corporal dos animais foi avaliada por meio de balança digital no último dia do período experimental. Os níveis séricos de glicose e insulina de jejum foram coletados no dia da realização do teste de tolerância à insulina (descrito abaixo), no tempo 0 do teste. Para determinação do valor de glicose sanguínea utilizou-se um glicosímetro portátil (*Advantage, Boehringer, Mannheim, Germany*). A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada pelo método ELISA (*Crystal Chem Inc., Chicago, IL*).

Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

No final da quinta semana de treinamento realizou-se o teste de tolerância à insulina. O teste foi realizado 24 horas após a última sessão de exercício físico. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue correspondeu ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (2U/Kg de massa corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose durante a fase de decaimento linear (BONORA et al., 1989).

Extração do músculo esquelético e tecido adiposo

No final da sexta semana, após 24 horas da última sessão de exercício físico e jejum de 6 horas, os ratos foram anestesiados através da administração de uma dose intraperitoneal de ketamina (40-87 mg/kg) associada a xylazina (5-13 mg/kg). A perda dos reflexos podal e da córnea foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e após localização da veia porta-hepática, 0,2 ml de salina ou de insulina (10^{-6} mol/l) foram

injetadas. A injeção de insulina foi utilizada para estimular positivamente a via de sinalização da insulina e para análise da fosforilação da Akt no músculo gastrocnêmio dos animais. A injeção de salina, por sua vez, foi realizada para simular o estresse recebido pelo grupo tratado com insulina (grupo controle negativo). Amostras do músculo gastrocnêmio (porção mista) foram extraídas e homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente, foi realizada a determinação do extrato total e incubação com anticorpo específico, conforme procedimentos prévios (PAULI et al., 2008). Ao final dos procedimentos experimentais o tecido adiposo epididimal foi retirado para avaliação de sua massa total em balança analítica. Os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia.

Imunoblot

Utilizando-se a concentração de 150µg/µL de proteínas foram calculados os volumes de aplicação de cada amostra. Observando os valores encontrados foi estabelecido um volume final de aplicação de 20 µL em cada poço do gel, sendo que ao volume correspondente a 150µg/µL de proteínas de cada amostra foram adicionados 5 µL de *Laemmli* (1/4 do volume final) e completou-se com tampão de extração até atingir os 20 µL desejados. Após este preparo, as amostras foram fervidas a 95°C por 5 minutos e posteriormente aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Ultra Cruz*[®], Santa Cruz *Biotechnology, CA, EUA*) em aparelho de transferência da BIO-RAD[®]. Para o controle do processo de transferência e da quantidade de proteínas em cada amostra, a

membrana de nitrocelulose foi realizado a coloração das proteínas através da solução de *Ponceau S* (0.1% Ponceau em 5% de ácido acético - *Sigma-Aldrich*, EUA). Após isto, foi visto que todas as colunas continham as mesmas quantidades de proteínas, entretanto para garantir a homogeneidade na quantidade de proteína entre as amostras, foram realizadas as análises de expressão total da proteína GAPDH e da proteína Akt total. Posteriormente, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 2 horas. O método de identificação utilizado foi a quimioluminescência, no qual as proteínas de interesse são detectadas incubando-se as membranas com anticorpos primários e em seguida, com anticorpos secundários conjugados com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP). As bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência e a densitometria determinada por meio de sistema de captação e análise de imagem.

Anticorpos

Os anticorpos utilizados para o imunoblot foram anti-Akt e anti-fosfo-serina Akt (Ser473) ambos da Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos experimentais, utilizou-se análise de variância, seguida de teste *post hoc* de Bonferroni, sendo adotado o nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros fisiológicos e metabólicos

A Tabela 2 compara os dados dos ratos do grupo controle (C), dos ratos obesos sedentários (OS), dos ratos obesos que foram submetidos ao treinamento físico sem sobrecarga adicional (OT -1) e dos ratos obesos submetidos ao treinamento com sobrecarga (OT-2). Observa-se que a massa corporal dos animais dos grupos OS, OT-1 e OT-2 foram maiores em relação ao grupo controle, que recebeu dieta padrão no final do experimento. No entanto, verifica-se que os animais dos grupos treinados apresentaram menor massa corporal em relação ao grupo OS. Além disso, nota-se que os animais submetidos ao protocolo de treinamento com sobrecarga adicional de 5% (OT-2) tiveram menor massa corporal em relação ao grupo que treinou sem sobrecarga (OT -1) ao término do estudo.

Em relação ao conteúdo de gordura epididimal, os resultados foram bastante semelhantes aos encontrados na avaliação da massa corporal total. Os roedores pertencentes aos grupos OS, OT-1 e OT-2 apresentaram massa da gordura epididimal superior quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, quando comparou-se o grupo OS com os grupos OT-1 e OT-2, os animais treinados apresentaram menor conteúdo de gordura epididimal no final do experimento. Além disto, não foi observada diferença na quantidade de gordura epididimal entre os grupos OT-1 e OT-2.

Quanto à glicemia de jejum, os animais dos grupos OS e OT-1 apresentaram valores superiores aos grupos controle e OT-2. Satisfatoriamente, independentemente do protocolo de treinamento físico recebido, os ratos treinados obtiveram menor glicemia de jejum quando comparados aos ratos obesos sedentários no final do estudo. Além disso, verifica-se que os animais treinados com sobrecarga (OT-2) apresentaram valores inferiores aos seus pares do grupo OT-1, que treinaram sem carga.

Por fim, os valores de insulinemia de jejum foram significativamente maiores nos ratos OS quando comparados aos demais grupos estudados. O treinamento físico possibilitou que não houvesse diferença entre os valores de insulina sanguínea entre os grupos controle e treinados, OT-1 e OT-2 no final do experimento.

Tabela 2 - Parâmetros fisiológicos.

	Massa Corporal (g)	Gordura Epididimal (g)	Glicemia jejum (mg/dL)	Insulinemia jejum (ng/mL)
C (n=6)	355 ± 10,6	6,5 ± 1,33	92,8 ± 2,96	2,46 ± 0,68
OS (n=6)	534 ± 16,8*	25,4 ± 3,68*	121 ± 7,32*	3,96 ± 0,86*
OT-1 (n=6)	498 ± 9,33* [#]	16,6 ± 4,21* [#]	108 ± 5,54* [#]	2,69 ± 0,32 [#]
OT-2 (n=6)	472 ± 11,58* ^{#,¥}	12,8 ± 4,28* [#]	98,6 ± 4,58 ^{#,¥}	2,58 ± 0,48 [#]

p<0,05 diferente do grupo controle (C); [#]p<0,05, diferente do grupo OS; [¥]p<0,05 diferente do grupo OT-1.

Fonte: Os autores.

O treinamento físico aumentou a fosforilação da proteína quinase B (Akt) no músculo esquelético dos ratos obesos

Na Figura 1, está representada a fosforilação da proteína Akt após estímulo com solução salina e insulina nos grupos estudados. Houve aumento na fosforilação da Akt nos ratos controles que receberam injeção de insulina de 3 vezes, quando comparado a seus pares com injeção de salina. Nos ratos OS, a fosforilação da Akt foi reduzida após estímulo com insulina em 1,9 vezes, quando comparado aos ratos

controles. Nos animais OT-1 e OT-2, a fosforilação da Akt aumentou em 1,6 e 1,9 vezes, respectivamente, ao compará-los aos animais OS. Além disso, o grupo OT-2 apresentou maior fosforilação da Akt em relação aos ratos OT-1. Entretanto, cabe salientar que esta melhora da ativação da Akt não ocorreu devido ao aumento da expressão desta proteína (Akt total) nos grupos estudados. Tendo em vista que não houve diferença na expressão da Akt entre os grupos, painel inferior da Figura 1.

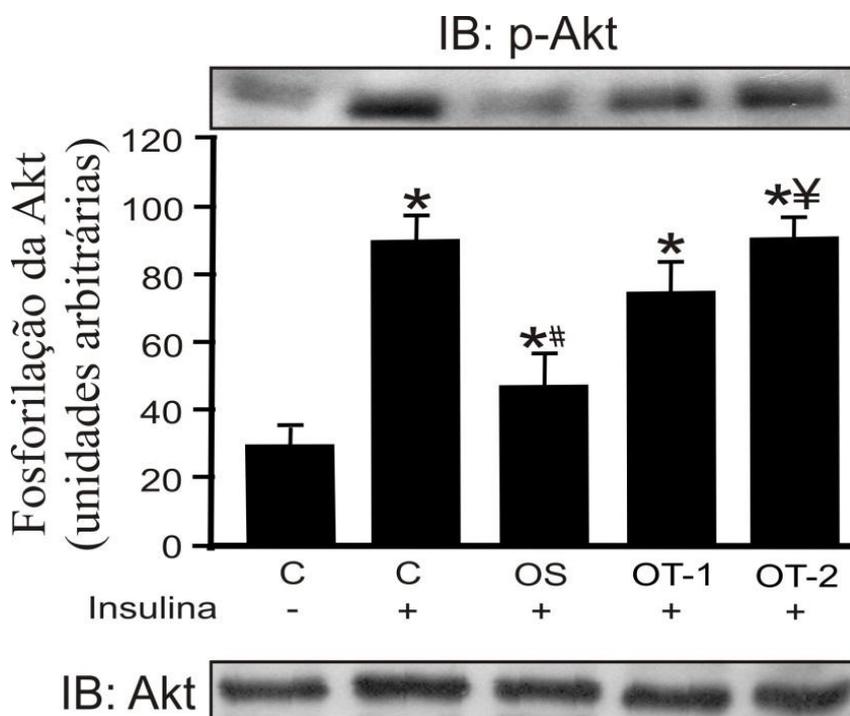


Figura 1 - Fosforilação e expressão da proteína Akt no músculo gastrocnêmio. Após injeção de solução salina (-) ou de insulina (+) nos ratos, foram extraídas amostras do músculo gastrocnêmio. Western blot representativo da p-Akt no painel superior. Expressão total da proteína Akt no painel inferior. *p<0,05, diferente do grupo controle salina (C); [#]p<0,05, Grupo OS diferente do grupo C estimulado com insulina, grupo OT-1 e grupo OT-2. [¥]p<0,05, diferente do grupo OT-1. IB: imunoblot.

Fonte: Os autores.

Treinamento físico aumenta a sensibilidade à insulina

Na Figura 2, são apresentados os resultados da constante de decaimento da glicose durante o teste de tolerância à insulina (Ktti). Observou-se que os ratos obesos sedentários tiveram redução significativa na captação de glicose em relação aos grupos controle e treinados. Por outro lado, os animais treinados tiveram aumento na taxa de

consumo de glicose quando comparados aos animais obesos sedentários, apresentando resultados similares aos animais controles magros. Contudo, não houve diferença na sensibilidade à insulina entre os grupos submetidos aos protocolos de treinamento físico. Os valores obtidos foram: C: $5,4 \pm 0,69$; OS: $1,98 \pm 0,48$; OT-1: $4,36 \pm 0,94$; OT-2: $4,89 \pm 0,56$.

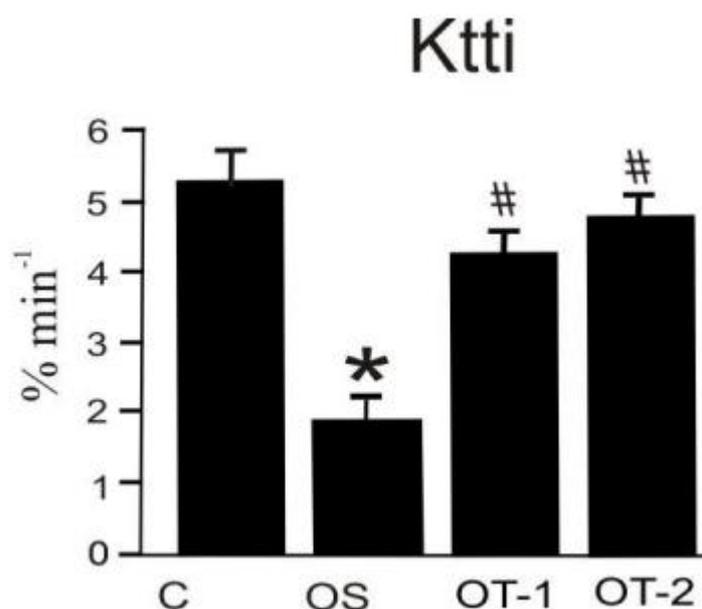


Figura 2 - Constante de decaimento da glicose (Ktti) durante o teste de tolerância à insulina dos diferentes grupos estudados. * $p < 0,05$, ratos obesos sedentários (OS) versus ratos controles (C); # $p < 0,05$, ratos treinados (OT-1 e OT-2) versus ratos obesos sedentários (OS).

Fonte: Os autores.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível constatar que ambos os protocolos de treinamento físico tiveram papel importante em aumentar a sensibilidade à insulina e prevenir um ganho excessivo de massa corporal (total) e de gordura epididimal dos animais obesos induzidos por dieta rica em gordura. Ademais, o treinamento físico aumentou a fosforilação da proteína Akt no músculo esquelético dos animais obesos. No entanto, vale destacar que os animais submetidos ao protocolo de treinamento físico com sobrecarga apresentaram valores de massa corporal e de glicemia de jejum inferiores, além de apresentarem maior fosforilação da proteína Akt quando comparados ao grupo treinado sem sobrecarga.

Em estudos semelhantes na literatura que utilizaram o treinamento físico como forma de tratamento para a obesidade e diabetes, verifica-se que há uma consistência e coerência com os dados encontrados em nosso estudo. Utilizando protocolo de natação similar ao aplicado neste estudo (PAULI et al., 2009a) observaram melhora da sensibilidade à insulina, redução da glicemia e da insulinemia de jejum em ratos *Wistar* obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Em outro estudo realizado com um protocolo de treinamento físico (TF) aeróbio de esteira, na intensidade de 15m/min, durante 40 min, cinco vezes na semana, em oito semanas, verificou-se redução da massa corporal de camundongos C57BL/6J obesos induzidos por dieta hiperlipídica quando comparados aos seus pares obesos sedentários (RAO et al., 2013). Estes resultados foram acompanhados pelo aumento da

sensibilidade à insulina e diminuição da insulinemia de jejum dos animais obesos treinados. Em relação aos parâmetros moleculares avaliados, os camundongos submetidos ao treinamento físico tiveram aumento significativo da fosforilação da Akt e da sinalização da insulina. Isso mostra que tanto o treinamento aeróbio de natação quanto de corrida são capazes de induzir melhoras na glicemia e na sensibilidade à insulina de roedores obesos (PAULI et al., 2009a),

Utilizando-se de um protocolo de exercício que consistiu de natação de 1 hora por dia, 5 vezes na semana, com sobrecarga adicional progressiva até 5% da massa corporal total dos animais, num período de 8 semanas em ratos obesos, Oliveira e colaboradores observaram melhora na sinalização da insulina nos tecidos muscular, hepático e adiposo (OLIVEIRA et al., 2011). Foi observado um aumento da fosforilação do receptor de insulina (IR), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e da proteína Akt, seguido por melhora na sensibilidade à insulina nos animais obesos submetidos ao treinamento físico. Adicionalmente, Oliveira e colaboradores mostraram que as respostas encontradas a nível molecular e fisiológico perduraram até 36 horas após a última sessão do treinamento físico, o que ocorreu mesmo não havendo alterações na massa corporal total dos animais (OLIVEIRA et al., 2011).

Ao analisar as respostas do treinamento físico no músculo esquelético de humanos, foram encontrados semelhanças nos mecanismos de melhora da captação de glicose vistos em roedores. Em um elegante estudo de Frosig e colaboradores (FROSIG et al., 2007), foi possível observar, a partir do teste *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico, que o TF de extensão de joelho de três semanas, em oito homens saudáveis com idade média de 25 anos, foi capaz de aumentar a captação de glicose em até 60% na perna que foi exercitada quando comparada à perna não exercitada no mesmo período. Evidenciou-se também um aumento nos níveis de Akt1/2 e GLUT4 na perna treinada. Além disto, tanto em situação de repouso quanto em resposta ao estímulo com insulina foi observado um aumento na atividade e fosforilação da Akt, provocando, por conseguinte, maior fosforilação da AS160

(proteína substrato da Akt, responsável pela indução da translocação do GLUT4 para a membrana celular, desencadeando aumento da captação de glicose) na perna submetida ao treinamento físico (FROSIG et al., 2007).

Em outro estudo utilizando pessoas não diabéticas e diabéticas, Christ-Roberts e colaboradores (CHRIST-ROBERTS et al., 2004), ao submeterem seus voluntários a um protocolo de treinamento físico aeróbio de oito semanas, em cicloergômetro de perna, observaram que tanto para os indivíduos não diabético quanto para os diabéticos, o treinamento foi eficiente para melhorar a sensibilidade à insulina, avaliada pelo teste *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico. Além disso, notou-se que apesar de não ocorrer aumento da fosforilação da proteína Akt, o treinamento físico provocou um acréscimo nos níveis de Akt e de GLUT4 no músculo esquelético tanto nos indivíduos com ou sem diabetes, o que pode explicar a melhora da sensibilidade à insulina em ambos os grupos (CHRIST-ROBERTS et al., 2004).

Contudo, pode-se notar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre esta temática, utilizando o treinamento físico como forma de tratamento não farmacológico para a obesidade e diabetes, foram realizados apenas com um tipo de protocolo de treinamento físico para avaliar seus efeitos sobre a sensibilidade e transdução do sinal da insulina. Desta forma, ainda não é possível dizer qual protocolo de TF que induz respostas mais eficientes sobre a sinalização da insulina e, por conseguinte, para o tratamento destas doenças.

Assim, ao analisar a literatura na tentativa de encontrar uma resposta a essa questão, encontramos um estudo de Da Silva e colaboradores (DA SILVA et al., 2010), que utilizou dois protocolos de exercício físico agudo com volumes e intensidades diferentes. Os autores observaram que ao aplicarem um protocolo de maior volume (6 horas de exercício sem carga adicional) e um protocolo de maior intensidade e menor volume (45 minutos de natação com sobrecarga de 5,5% da massa corporal) em ratos obesos, ambos foram eficazes em melhorar a sensibilidade à insulina e aumentar a fosforilação de proteínas da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1 e Akt). Deste modo, os autores foram capazes de evidenciar

que um exercício físico agudo de menor duração, porém com uma intensidade moderada, foi capaz de trazer resultados similares aos encontrado com um protocolo de volume prolongado.

Seguindo a mesma linha de se utilizar dois protocolos de exercício físico agudo em cicloergômetro com diferentes intensidades, Sakamoto e colaboradores (SAKAMOTO et al., 2004) aplicaram um exercício submáximo (de intensidade moderada), de 30 minutos a 75% da carga máxima do voluntário e um exercício de intensidade alta, que consistiu em 6 tiros de 60 segundos a 125% da carga máxima, com 30 segundos de intervalo entre os esforços, em oito indivíduos saudáveis (três mulheres e cinco homens, com média de idade de 30,4 anos). Eles observaram que, tanto o exercício máximo, como o submáximo foram capazes de aumentar a atividade da Akt (em 110% e 40%, respectivamente), e este incremento da ação da Akt foi acompanhado pelo aumento da fosforilação de seus resíduos de treonina 308 e serina 473. Entretanto, de forma similar ao resultado apresentado no presente estudo, o incremento da atividade da Akt não foi causado pelo aumento da expressão desta proteína, mas sim, pelo aumento de sua fosforilação (SAKAMOTO et al., 2004).

Apesar destas evidências serem de grande importância à literatura, tendo em vista que exercícios mais curtos são mais facilmente tolerados por obesos, sobretudo, no início de um programa de treinamento, é preciso ter cautela para afirmar se após um período de treinamento com sobrecargas diferentes seriam obtidas respostas biológicas iguais ou distintas. Não obstante, como estas diferentes sobrecargas repercutiriam na via de sinalização à insulina após um período de prática regular de exercícios físicos.

Tentando trazer uma resposta a esta lacuna, o presente estudo buscou avaliar se diferentes protocolos de treinamento físico de natação, com ou sem sobrecarga, durante seis semanas refletiriam de maneira diferente, ou não, no organismo de animais obesos. De acordo com os resultados encontrados, podemos concluir que ambos os protocolos foram eficientes para a redução da massa corporal e recuperação da homeostase glicêmica, exercendo um efeito protetor contra a obesidade e o diabetes. Ademais, mesmo o protocolo com sobrecarga de

5% da massa corporal dos animais tendo conseguido aumentar significativamente a fosforilação da proteína Akt quando comparado ao protocolo sem carga adicional, ambos obtiveram respostas fisiológicas similares no teste de tolerância à insulina. Isto evidencia que ambos foram positivos para o aumento da sensibilidade à insulina em animais obesos diabéticos.

Todavia, como as repostas fisiológicas foram semelhantes para ambos os tipos de protocolos de treinamento, acredita-se que outras moléculas participem da homeostase glicêmica em resposta ao esforço físico, promovendo o aumento na translocação do GLUT4 e, portanto, da captação de glicose. Alguns candidatos são as proteínas quinase dependente de AMP (AMPK), quinase dependente de calmodulina II (CAMKII) e a óxido nítrico síntase (NOS). Estas são proteínas/moléculas capazes de induzir a translocação do GLUT-4 independentemente de insulina (RICHTER; HARGREAVES, 2013). A AMPK é ativada em condição de déficit energético, quando a relação AMP/ATP está alta. A CAMKII é ativada em resposta ao aumento do conteúdo de cálcio intracelular das células musculares e NO se mostra aumentado em resposta ao exercício físico, sendo também capaz de estimular a translocação do GLUT-4 para a membrana celular e com isso aumentar a captação de glicose. Além disso, sabe-se que o exercício aumenta a sensibilidade à insulina em outros tecidos, como o adiposo (DA LUZ et al., 2011; PERES et al., 2005), o que favorece para a homeostase da glicose. Sendo que neste estudo não foi avaliado a captação de glicose no tecido adiposo. Deste modo, novas investigações relacionando a intensidade de exercício com estas proteínas se fazem necessário e ajudarão no entendimento do efeito do exercício físico sobre a homeostase glicêmica na condição de obesidade e diabetes.

Além do mais, se faz necessário apontar algumas limitações do estudo. O protocolo de treinamento utilizado não representa uma mesma carga de trabalho e gasto calórico total para ambos os grupos de animais (OT-1 e OT-2). Estudos futuros equiparados quanto à carga externa (produto da intensidade pelo volume) serão importantes para elucidar melhor se a intensidade de exercício é um fator determinante na ativação da Akt e sensibilidade à insulina.

Além disso, será importante fazer uma análise de glicose marcada específica no músculo esquelético para mensurar se a incorporação desta hexose em resposta a diferentes intensidades de treinamento são similares ou diferentes. Por fim, a avaliação da expressão e fosforilação de outras moléculas envolvidas na captação de glicose (AMPK, CAMKII, NOS) e a extração do tecido muscular em diferentes tempos após o exercício (0h, 1h, 8h, 16h, 24h, 36h) pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na homeostase da glicose em resposta ao treinamento físico.

Diante de tais achados e levando em conta as limitações do presente estudo, os resultados

mostram que tanto um protocolo de treinamento físico sem sobrecarga como com sobrecarga adicional a massa corporal dos animais são capazes de promover benefícios ao organismo de animais obesos, com melhoras na glicemia e insulinemia de jejum. Tais alterações estão relacionadas, ao mínimo em parte, ao aumento na sensibilidade à insulina corporal e da fosforilação da proteína Akt. Por fim, embora tenha sido evidenciado um aumento mais acentuado na fosforilação da proteína Akt no músculo esquelético dos animais obesos submetidos ao treinamento físico com sobrecarga, isso não repercutiu em adaptações mais significativas na sensibilidade à insulina desses animais.

INFLUENCES OF DIFFERENT PROTOCOLS OF PHYSICAL TRAINING ON THE PHOSPHORYLATION OF AKT PROTEIN IN SKELETAL MUSCLE AND INSULIN SENSITIVITY OF OBESE RATS

ABSTRACT

Investigate the effects of different protocols of physical training (PT) on insulin sensibility (IS) and Akt phosphorylation (p-Akt) in skeletal muscle of obese rats. Animals were distributed in four groups according to the diet and physical training: Control: received standard chow (C); Sedentary obese: received high fat diet (HFD) for 12 weeks (OS); Obese Trained 1: received HFD for 12 weeks and PT without overload for 6 weeks (OT-1); Obese Trained 2: received HFD for 12 weeks and PT with overload of 5% body weight (OT-2). Insulin tolerance test was used to evaluate the IS. Western blotting was performed to evaluate p-Akt and total Akt in gastrocnemius muscle. Results: The PT with overload induced greater p-Akt, however there isn't difference in SI when compared with the training without overload. Conclusion: Differences in p-Akt not induced better responses of IS in obese rats induced by HFD.

Keywords: Physical Training. Obesity. Insulin Signaling.

REFERÊNCIAS

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, Brossard, v. 68, no. 2, p. 374-378, Feb. 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BRUSS, M. D. et al. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. **Diabetes**, New York, v. 54, no. 1, p. 41-50, Jan. 2005.

CHRIST-ROBERTS, C. Y. et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, New York, v. 53, no. 9, p. 1233-1242, Sept. 2004.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 111, no. 9, p. 2015-2023, Sept. 2011.

DA SILVA, A. S. et al. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Medicine & Science in Sport & Exercise**, Madison, v. 42, no. 12, p. 2180-2188, Dec. 2010.

DESHMUKH, A. et al. Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. **Diabetes**, New York, v. 55, no. 6, p. 1776-1782, Jun. 2006.

FROSIG, C. et al. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. **Diabetes**, New York, v. 56, no. 8, p. 2093-20102, Aug. 2007.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILLI, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, Brossard, v. 86, no. 3, p. 972-979, Mar. 2001.

LIMA, A. F. et al. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 221, no. 1, p. 92-97, Oct. 2009.

- LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European journal of endocrinology**, Oslo, v. 147, no. 1, p. 149-157, July 2002.
- MARINHO, R. et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 227, no. 7, p. 2917-2926, July 2012.
- MATOS, A. et al. Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice. **Acta Physiol (Oxf)**, Oxford, v. 198, no. 1, p. 61-69, Jan. 2010.
- O'GORMAN, D. J. et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 49, no. 12, p. 2983-2992, Dec. 2006.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**, New York, v. 60, no. 3, p. 784-796, Mar. 2011.
- PÁDUA, M. F. D. et al. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 15, p. 179-184, 2009.
- PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 53, p. 399-408, 2009a.
- PAULI, J. R. et al. Efeitos do exercício físico na expressão e atividade da AMPKalfa em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 98-103, 2009b.
- PAULI, J. R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology**, London, v. 586, no. 2, p. 659-671, Jan. 2008.
- PERES, S. B. et al. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 98, no. 3, p. 1037-1043, Mar. 2005.
- RAO, X. et al. Exercise Protects against Diet-Induced Insulin Resistance through Downregulation of Protein Kinase Cbeta in Mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, no. 12, p. e81364, 2013.
- RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiological Reviews**, Washington, DC, v. 93, no. 3, p. 993-1017, July 2013.
- ROPELLE, E. R. et al. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. **Journal of Physiology**, London, v. 587, no. Pt 9, p. 2069-2076, May 2009.
- ROPELLE, E. R. 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. **Journal of Physiology**, London, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec. 2006.
- SAKAMOTO, K. et al. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 319, no. 2, p. 419-425, June 2004.
- SARVAS, J. L.; KHAPER, N.; LEES, S. J. The IL-6 Paradox: context dependent interplay of SOCS3 and AMPK. **Journal of Diabetes & Metabolism**, Sunnyvale, v. 13, May 2013. Suppl.

Recebido em 29/04/2014
Revisado em 12/07/2014
Aceito em 11/12/2014

Endereço para correspondência: José Rodrigo Pauli – R. Pedro Zaccaria, 1300 - Caixa Postal 1068, CEP 13484-350. Limeira - São Paulo. E-mail: rodrigopaulifca@gmail.com