

Mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulina em animais destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídes

José Rodrigo Pauli
Dennys Esper Cintra
Eduardo Rochete Ropelle
Cláudio Teodoro de Souza
Juliana Contin Moraes
Mário José Abdalla Saad

Laboratório de investigação dos mecanismos moleculares de sinalização da insulina do Departamento de Clínica Médica – FCM/Unicamp SP

Resumo: A cessação do treinamento físico (destreinamento) resulta em rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos quanto em animais. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos. Diferentes proteínas intracelulares podem estar envolvidas no processo de aquisição de ganho de peso e diminuição na ação da insulina nesse modelo animal. Este estudo teve como objetivos investigar as vias PI 3-quinase/Akt e CAP/Cbl, ambas importantes na captação ou utilização de glicose estimulada por insulina no tecido muscular adiposo branco. Utilizou-se, ratos Wistar que foram submetidos a um protocolo de exercício de natação por 8 semanas. Posteriormente os animais foram destreinados e nesse mesmo período de cessamento do programa de exercício foi oferecida aos ratos uma dieta rica em lipídes. Para análise das proteínas de interesse, foi realizado o método de imunoblot e imunoprecipitação. Verifica-se, através dos resultados obtidos, que animais destreinados tem um ganho de peso e de gordura epididimal mais acentuado comparado a animais sedentários. Esse fato foi associado a uma maior responsividade à insulina no tecido adiposo através da via IRS/PI 3-quinase/Akt dos animais destreinados submetidos à dieta rica em lipídes. Além disso, verifica-se, que a via CAP/Cbl encontra-se mais responsiva à insulina no tecido adiposo de animais destreinados em relação aos outros grupos experimentais. Conclui-se, que o destreinamento físico é acompanhado por um rápido período de ganho de peso e de massa adiposa e essas adaptações deve-se no mínimo em parte pela maior responsividade à insulina da via CAP/Cbl em tecido adiposo branco.

Palavras-chave: Destreinamento. Obesidade. Resistência à insulina.

Molecular mechanisms on induction obesity and insulin resistance in detrained animals submitted a high-fat diet

Abstract: The termination of exercise training (detraining) results in rapid fat accretion, weight gain and insulin resistance in both humans and rats. There is evident relationship between physical inactivity and insulin resistance. Different mechanisms may be involved in insulin resistance in this animal model. The aim of this study was to investigate the PI3-kinase/Akt and CAP/Cbl signaling pathways both involved with insulin-stimulated glucose uptake in white adipose tissue in detrained and sedentary animals submitted a high-fat diet. Wistar rats were submitted to swimming training during 8 weeks. Next this period the animals stop the training and received a rich-fat diet. The proteins from the insulin signaling pathway were analyzed by immunoprecipitation and immunoblotting. The results demonstrated that detraining result in an increased body mass and rapid body fat accretion. This fact was associated with increases insulin responsiveness in adipose tissue through IRS/PI3-Kinase/Akt pathway in detrained rats fed with a rich-fat diet. In addition, the CAP/Cbl pathway in adipose tissue was more insulin responsive in the detrained animals feeding with a rich-fat diet than S-DHL animals. In conclusion, the cessation of exercise is accompanied by increased body mass and rapid fat accretion and this aspect to have relation at least in part to increased insulin responsiveness in adipose tissue through CAP/Cbl pathway.

Key Words: Destraining. Obesity. Insulin resistance.

Introdução

A atividade física aumenta a sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal, e o principal efeito do exercício parece ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética (GOODYEAR; KAHN 1998; BASSUK; MANSON 2005). Por outro lado, a cessação do treinamento físico (destreinamento) resulta em rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos (PERIZKOVA, 1977; ALMÉRAS et al., 1997) quanto em animais (APPLEGATE; STERN 1987; WALBERG et al., 1983; ECKEL; YOST, 1987). Tal consideração pode ser reforçada por outros estudos que demonstraram que a sensibilidade à insulina decresce em alguns dias quando indivíduos fisicamente ativos se tornam sedentários (KRISKA et al., 1993; MAYER-DAVIS et al., 1998). Considerando as evidências descritas acima, pode-se dizer que o músculo esquelético tem papel primordial sobre a redução da utilização de glicose estimulada por insulina na situação de inatividade física. No entanto, são poucos os estudos que investigaram as adaptações moleculares frente à situação de destreinamento.

Para abordar os mecanismos pelo qual o cessamento do exercício físico diminui a captação de glicose estimulada por insulina, aumenta o ganho de peso e causa rápido acréscimo da massa adiposa, é necessário inicialmente descrever como a insulina transmite seu sinal desde seu receptor até os efetores finais.

A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise, entre outros (SALTIEL; KAHN, 2001). A compreensão das etapas moleculares de sinalização à insulina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, diabetes mellitus do tipo 2, hipertensão arterial e intolerância à glicose associada a diversas endocrinopatias.

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

1) e (IRS-2) (WHITE 1998). Após a fosforilação em tirosina, IRS-1 e IRS-2 associam-se e ativam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). A ativação da PI 3-quinase aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt) (PESSIN; SALTIEL 2000), que então estimula o transporte de glicose no músculo e tecido adiposo, estimula a síntese de glicogênio no fígado e músculo, e estimula a lipogênese no tecido adiposo. Portanto, a via PI 3-quinase/Akt tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina.

Além da ativação da PI 3-quinase, outros sinais também podem ser necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose (PESSIN; SALTIEL 2000). Essa segunda via envolve a fosforilação do protooncogene c-Cbl e é aparentemente independente da ativação da PI 3-quinase (RIBON; SALTIEL 1997). Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP ("Cbl-associated protein") (RIBON et al., 1998). Após a fosforilação o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína adaptadora CrkII, que também está constitutivamente associada com a proteína C3G (BRAUMANN et al., 2000). A C3G é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, ativando-a. Uma vez ativada, a TC10 desencadeia um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT4 para a membrana celular, em paralelo à ativação da via da PI 3-quinase (CHIANG et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que a insulina estimula agudamente a fosforilação em tirosina de Cbl e sua associação com a CAP no tecido adiposo de animais normais, e também que essa via pode participar do controle da adiposidade em modelos animais de resistência à insulina.

Desde que as vias PI 3-quinase/Akt e CAP/Cbl desempenham papel importante na captação de glicose, sugere-se que ambas possam determinar pelo menos em parte, a entrada de glicose no tecido adiposo e consequentemente contribuir com o aumento da massa adiposa corporal. Portanto, a avaliação destas vias moleculares frente a uma situação de destreinamento físico é pertinente de investigação. Assim, os objetivos do nosso estudo são avaliar o ganho de peso, a sensibilidade periférica à insulina e as alterações moleculares envolvidas na sinalização da insulina através das vias IRS/PI 3-quinase/Akt e CAP/Cbl em tecido adiposo branco de animais destreinados alimentados ou não com uma dieta rica em lipídeos.

Matérias e Métodos

Animais experimentais e protocolos de pesquisa

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos descritos pela *National Motriz, Rio Claro, v.13, n.2 (Supl.1), p.S19-S28, mai./ago. 2007*

Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada de 22°C a 24 °C e com ciclos de luz artificial (12 horas claro e 12 horas escuro). Após 3 dias de aclimação, ratos Wistar machos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais com similar peso corpóreo (250 ± 5 g): ratos controles alimentados com dieta padrão para roedores (C), ratos sedentários alimentados com dieta padrão (semanas 1-8) e alimentados com uma dieta hiperlipídica (semanas 9-16) (S-DHL), ratos destreinados alimentados com dieta padrão (semanas 1-8) e alimentados com uma dieta hiperlipídica (semanas 9-16) (D-DHL) e ratos destreinados alimentados com dieta padrão para roedores (semanas 1-16) (D-DC).

Protocolo de exercício físico

O protocolo de exercício consistiu de natação, em grupos de 4 animais, que foi realizado em baldes plásticos com diâmetro de 60 cm e com profundidade de 100 cm. A temperatura da água foi mantida entre 34 °C e 35 °C.

Os animais dos grupos D-DHL e D-DC nadaram 1h/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas consecutivas, suportando uma sobrecarga que foi progressivamente aumentada em 2.5% a 5% do peso corporal do animal relativo a cada semana. O programa de exercício descrito acima foi interrompido ao final da 8ª semana, e esse período de inatividade física foi denominado de destreinamento, e perdurou por mais 8 semanas (semanas 9-16).

Avaliação de parâmetros fisiológicos

Ratos Wistar de ambos os grupos foram avaliados quanto à evolução de massa corpórea e ingestão alimentar semanalmente. O tecido adiposo epididimal foi cuidadosamente dissecado e pesado em balança analítica. Níveis sanguíneos de glicose e insulina foram avaliados ao final do período experimental. Seis animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização do teste de tolerância à insulina.

Determinação da glicose, insulina e leptina.

A dosagem dosagem da glicose plasmática foi realizada através do método enzimático colorimétrico de glicose oxidase. A insulina plasmática das amostras de soro foram avaliadas por radioimunoensaio.

Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)

O teste foi realizado ao final do período experimental. Após jejum noturno de 6 h a primeira coleta de sangue foi

realizada (tempo 0) do teste. Após isso, a insulina (2U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do 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 sérica durante a fase de decaimento linear.

Extração do tecido adiposo branco

Os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (4mg/100g de peso corporal) e para controle de anestesia foram observados os reflexos pedal e de córneo dos ratos antes de qualquer procedimento experimental. A cavidade abdominal foi aberta, e após localização da veia porta 0,2 ml de salina ou insulina (10^{-6} mol/l) foi injetada. Amostras do tecido adiposo epididimal foram retiradas após 90 s da infusão de insulina. Esse tecido foi homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11.000 RPM por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford de 1976. (BRADFORD 1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoprecipitação com anticorpo específico.

Anticorpos e reagentes utilizados

Os anticorpos, anti-fosfotirosina (α -PY), anti-IR β (α -IR), anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-c-Cbl (α -Cbl), anti-CAP (α -CAP), anti-fosfo-C3G, foram providos da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-fosfo-Akt [ser 473] foi da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) e a subunidade p85 da PI 3-quinase foi da Upstate Biotechnology, NY. Os reagentes de rotina utilizados foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Imunoprecipitação (IP)

Após determinação da concentração das proteínas foi realizada a imunoprecipitação com anticorpo específico. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sefarose 6 MB por 2 horas à 4°C e decantados por centrifugação por 20 minutos à 4°C/11.000 RPM. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O

sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas (imunocomplexos).

Imunoblot (IB)

Os imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT. Após rápida fervura foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada "overnight" com anticorpo específico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O sinal foi detectado por tratamento com 2 μ Ci de [125I] Proteína A (30 μ Ci/ μ g) em 10 mL de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak à -80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica através do programa Scion Image.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparando dois grupos, foi utilizado teste t de Student para dados não pareados. Quando necessário foi utilizada análise de variância, seguida de teste para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância $P < 0.05$.

Resultados

Tabela 1. Observa-se que os animais que receberam uma dieta rica em lipídes tiveram maior ganho de peso em relação aos animais que se alimentaram apenas da dieta padrão para roedores. No entanto, evidencia-se, que os animais do grupo D-DHL apresentaram um ganho maior de peso quando comparado aos ratos do grupo S-DHL. Em relação aos níveis de glicose em repouso apenas o grupo D-DHL apresentou maior concentração quando comparado aos ratos controles. Para insulina sérica, ambos os grupos de animais S-DHL e D-DHL tiveram a concentração mais elevada se comparada aos controles.

Tabela 1. Peso corporal, concentração de glicose e insulina sérica dos animais controles, S-DHL, D-DHL e D-DC.

Parâmetros	Controle (n=8)	S-DHL (n=8)	D-DHL (n=8)	D-DC (n=8)
Peso corporal (g)	394.00 \pm 3.82	486.75 \pm 3.97 [#]	524.50 \pm 5.14 [*]	410.75 \pm 5.14
Glicose Sérica (mg/dL)	83.50 \pm 5.50	89.50 \pm 1.50	100.60 \pm 2.02 [*]	85.40 \pm 2.12
Insulina Sérica (ng/ml)	2.57 \pm 0.10	3.15 \pm 0.11 [*]	3.59 \pm 0.21 [*]	2.45 \pm 0.12

Dados são expressos como média \pm erro padrão da média, com 8 animais por grupo (n=8). * $P < 0.05$ versus Controle e # $P < 0.05$ S-DHL versus D-DHL.

Características dos animais

Figura 1 - A evolução do peso corporal não foi diferente nos grupos estudados até a 8ª semana. Entretanto, verifica-se, que os animais submetidos a uma dieta hiperlipídica, tiveram a partir da 9ª semana acréscimo maior de peso corpóreo, e isso, resultou em maior ganho final do peso em relação aos controles. Além disso, os animais D-DHL apresentaram na 14ª, 15ª e 16ª semanas de experimento um peso corporal estatisticamente maior quando comparado aos animais do grupo S-DHL (Fig. 1A). A média semanal de ingestão

alimentar mensurada em 24 horas não foi diferente nos grupos estudados (Fig. 2B).

No teste de tolerância à insulina (Kitt), observa-se, um distúrbio na taxa de desaparecimento da glicose, induzido pela dieta rica em lipídes nos animais S-DHL e D-DHL quando comparado aos controles (C e D-DC), e observa-se, menor consumo de glicose nos ratos D-DHL do que nos ratos S-DHL, após as 8 semanas de alimentação com a dieta hiperlipídica. Estes dados sugerem uma menor sensibilidade à insulina nos ratos D-DHL (Fig 2C). Nota-se, também, que o

tecido adiposo epididimal foi maior entre os animais S-DHL e D-DHL em relação aos grupos controles (C e D-DC), mas semelhantemente ao peso corpóreo, a gordura epididimal foi

maior nos animais D-DHL em comparação aos animais S-DHL (Fig. 2D).

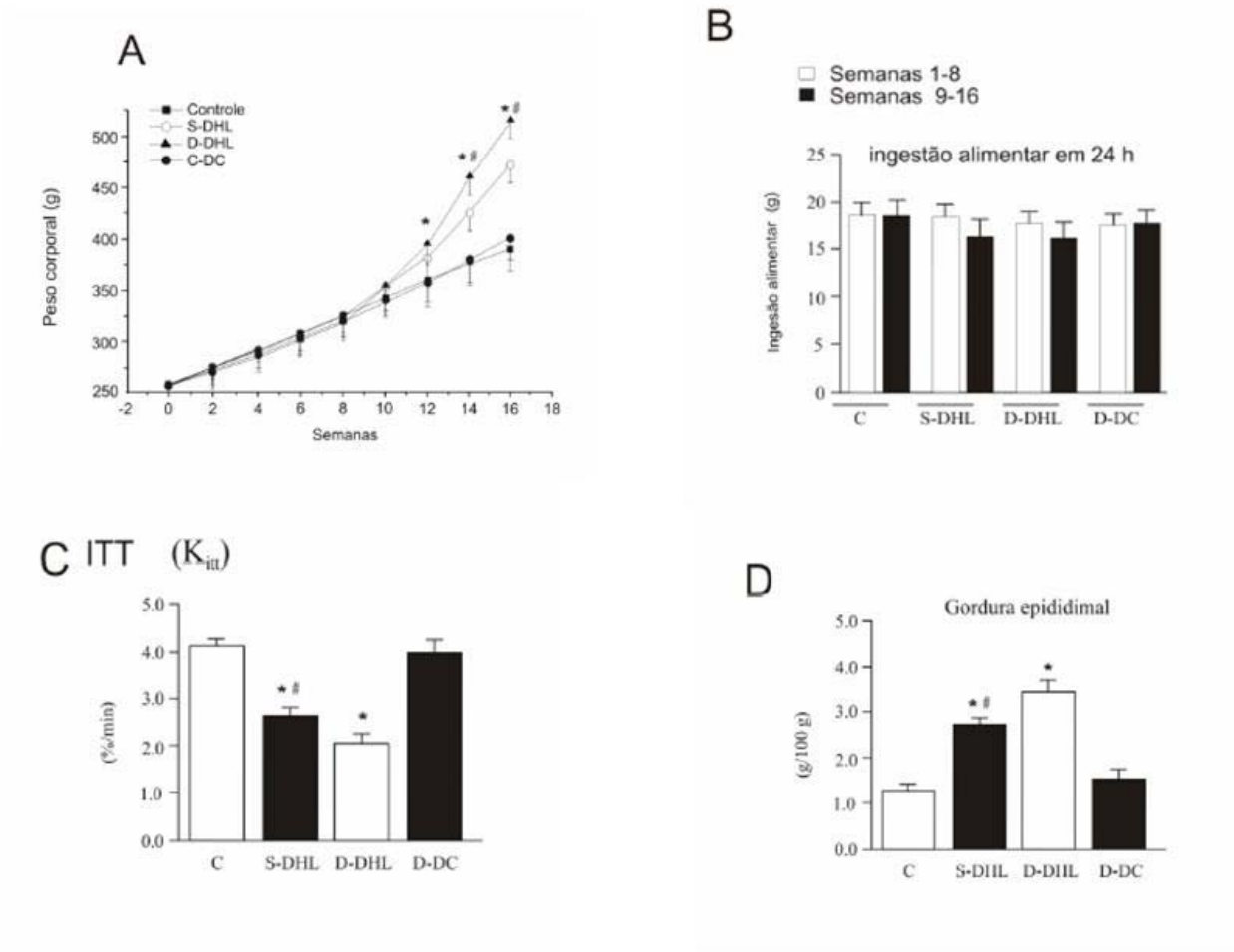


Figura 1. Características dos animais - A, temos a evolução do peso corporal dos animais durante as 16 semanas experimentais. B, foram apresentados os dados referentes à média de ingestão alimentar mensurada em 24 horas de cada grupo de animais. C, estão representados os resultados referentes ao teste de tolerância à insulina (Kitt) ao final do experimento. Por fim, a Fig. 1D, mostra o aumento da gordura epididimal de cada grupo de animais ao final do estudo. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média, em 8 animais por grupo (n=8). *P<0.05 versus Controle e #P<0.05 S-DHL versus D-DHL.

Sinalização da insulina no tecido adiposo branco (via IRSs/PI 3-quinase/Akt)

Na figura 2, os resultados mostram as conseqüências da ingestão de uma dieta rica em lipídes e do destreinamento físico sobre as etapas iniciais da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco. Houve redução significativa (40-50%) nos níveis de fosforilação em tirosina induzido por insulina do IR/IRS-1/IRS-2 (Fig. 2A, B, D), da associação

IRS-1/PI 3-quinase, IRS-2/PI 3-quinase e na ativação da Akt nos grupos S-DHL e D-DHL quando comparado com os ratos controles (Fig. 2C, E, F). Por outro lado, evidencia-se uma considerável redução nos níveis de fosforilação induzidos por insulina do IRS-1, IRS-2 (Fig. 2B, D) e na associação IRS-1/PI 3-quinase, IRS-2/PI 3-quinase e na fosforilação em serina da Akt (Fig. (2C, E, F) nos ratos S-DHL comparado aos ratos D-DHL. Os níveis de proteínas totais não foram diferentes entre os grupos estudados (dados não mostrados).

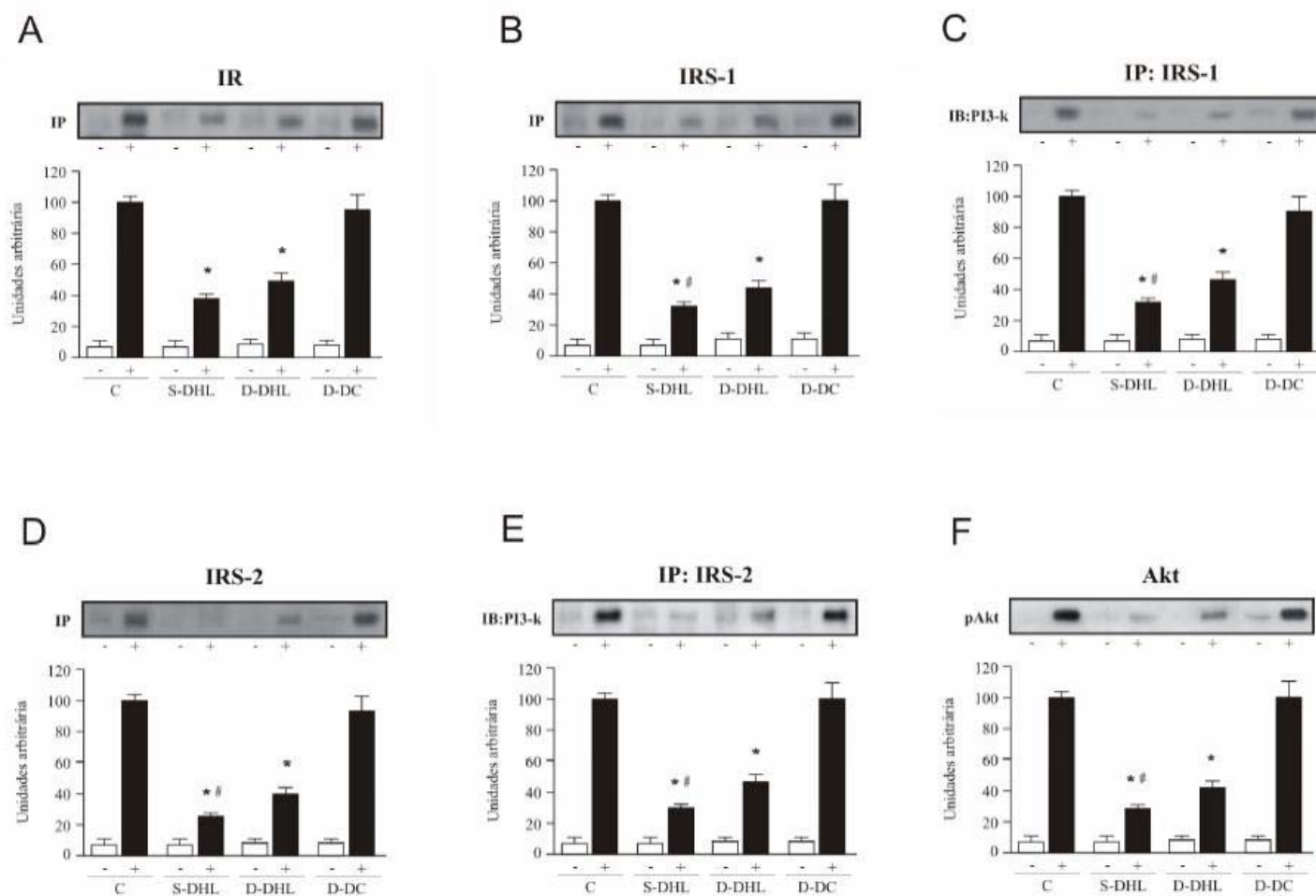


Figura 2. Sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal dos ratos controles, S-DHL, D-DHL e D-DC - Extratos do tecido adiposo epididimal de animais injetados com salina ou insulina foram preparados como descrito em materiais métodos. A, extratos do tecido adiposo foram imunoprecipitado (IP) com anticorpo anti-IR β e imunoblottado (IB) com anticorpo anti-fosfotirosina ou anti-IR β . B e C, extratos do tecido muscular também foram IP com anticorpos anti-IRS-1 e IB com anticorpos anti-fosfotirosina, anti-PI 3-quinase ou anti-IRS-1. D e E, extratos do tecido adiposo também foram IP com anticorpos anti-IRS-2 e IB com anticorpos anti-fosfotirosina, anti-PI 3-quinase ou anti-IRS-2. F, extratos da gordura epididimal foram IB com anticorpos, anti-fosfo Akt e anti-Akt. Os resultados obtidos após densitometria óptica das bandas autoradiografadas e analisadas no programa *Scion Image* foram expressos como unidades arbitrárias. As barras representam as médias \pm erro padrão da média dos animais (n= 8). *P<0.05 versus Controle e #P<0.05 S-DHL versus D-DHL.

Sinalização da insulina no tecido adiposo branco (via CAP/Cbl)

Figura 3 - Houve um aumento na expressão da proteína Cbl (32% e 62%) e na expressão da CAP (45% e 75%) no tecido adiposo branco nos ratos S-DHL e S-DHL, respectivamente, quando comparado aos ratos controles (Fig 3A, B). No entanto, fica evidente que houve um aumento na expressão dessas proteínas (Cbl e CAP) nos animais D-DHL

em relação aos animais do grupo S-DHL. Nota-se também, que houve um aumento na fosforilação em tirosina estimulada por insulina da Cbl (41% e 51%), e na associação CAP/Cbl (25% e 83%) no tecido adiposo nos ratos S-DHL e D-DHL, respectivamente, quando comparados aos ratos controles (Fig 3C, D). Além disso, verifica-se que nos animais D-DHL houve um significativo aumento na fosforilação em tirosina estimulada por insulina da proteína Cbl e da associação CAP/Cbl quando comparado aos animais S-DHL. Por fim,

Motriz, Rio Claro, v.13, n.2 (Supl.1), p.S19-S28, mai./ago. 2007

observa-se, que ao estímulo da insulina, a proteína C3G teve um aumento na sua fosforilação em tirosina (32% e 93%) no tecido adiposo branco nos grupos S-DHL e D-DHL, respectivamente, comparado com os animais controles (Fig.

3E). Outra vez, nos animais D-DHL a fosforilação em tirosina da C3G quando estimulada por insulina foi maior do que a encontrada nos animais S-DHL.

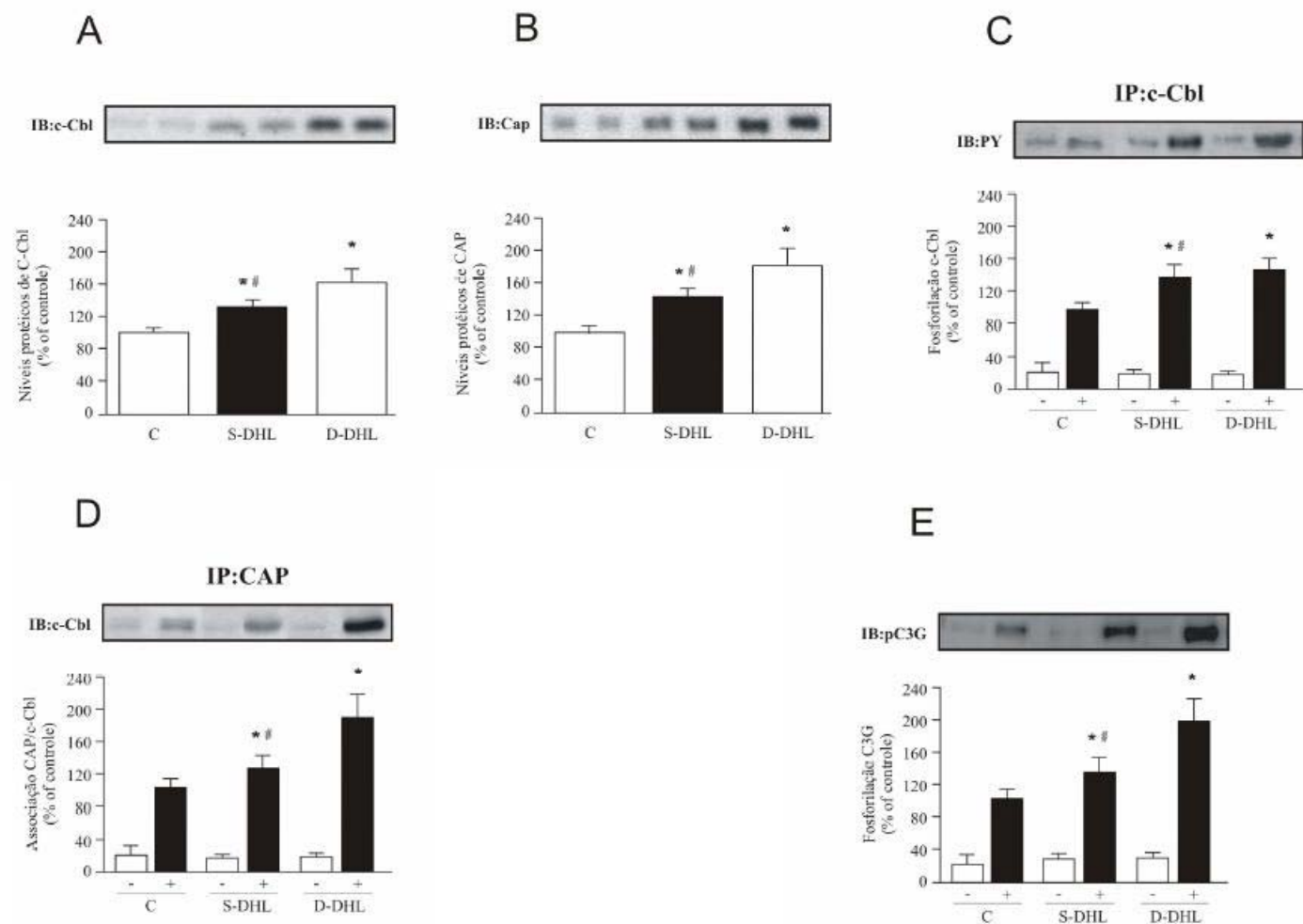


Figura 3. Via CAP/Cbl do tecido adiposo dos animais controles, S-DHL, D-DHL e D-DC - Extratos do tecido adiposo foram IB com anticorpos c-Cbl (A); α CAP (B); e IP com anticorpo α -c-Cbl e IB com α -fosfotirosina (C); IP com anticorpo α -c-Cbl e IB com α -CAP (D); IB com anticorpo α -p-C3G (E). Os resultados obtidos após densitometria óptica das bandas autoradiografadas e analisadas no programa *Scion Image* foram expressos como unidades arbitrárias. As barras representam as médias \pm erro padrão da média dos animais (n= 6). *P<0.05 versus Controle e #P<0.05 S-DHL versus D-DHL.

Discussão

Estudos em modelos animais e humanos mostram que a cessação do exercício físico leva a um aumento de peso corpóreo e a um rápido acréscimo do tecido adiposo (ALMÉRAS et al., 1997; APPLGATE; STERN 1987; WALBERG et al., 1983; ECKEL; YOST, 1987). Entretanto, em algumas pesquisas, o destreinamento físico tem sido

associado com um aumento na ingestão de calorias diárias, especialmente em ratos geneticamente predispostos a obesidade (APPLGATE; STERN 1987; SCHEMMEL; MICKELSEN; GILL 1970). Com isso, tem sido difícil separar os efeitos referentes a mudanças alimentares, dos resultantes da cessação do treinamento físico. Em nosso estudo, não tivemos alterações na ingestão de ração entre os

grupos experimentais, pode-se assim, descartar qualquer interferência de uma possível hiperfagia com o destreinamento. Portanto, o aumento significativo no ganho de peso e no acréscimo de tecido adiposo obtido pelos animais D-DHL quando comparados aos ratos S-DHL pode ser atribuído pela interrupção do programa de exercício de natação por si, sugerindo-se que o período de destreinamento promove um aumento na capacidade lipogênica independente de mudanças na ingestão de calorias ingeridas. Em acordo com nossos resultados, Lampert e colaboradores demonstraram que a razão do ganho de peso em 1 e 2 semanas em ratos destreinados foi significativamente maior do que animais sedentários ou treinados, e não houve diferenças na ingestão alimentar entre os grupos (LAMBERT et al., 1994). Em similaridade aos dados encontrados em nosso estudo, Giada e colaboradores, encontrou após 2 meses de destreinamento, um aumento de 2% e 4% na massa de tecido adiposo em ciclista jovens e idosos, respectivamente (GIADA et al., 1995).

Interessantemente, observa-se, em nosso estudo, que os ratos destreinados alimentados com a dieta padrão tiveram o peso e a gordura epididimal semelhante aos ratos controles. Parece evidente, então, que a sobrecarga energética (dieta hiperlipídica) associada à condição de destreinamento físico foi responsável pelas alterações mais acentuadas no ganho de peso e de gordura epididimal encontrada nos animais do grupo D-DHL com relação aos demais grupos estudados.

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

Estudos prévios mostraram que o exercício físico aumenta a responsividade à insulina em adipócitos, músculo esquelético, e este aumento na captação de glicose envolve no mínimo em parte a participação da via IRSs/PI 3-quinase/Akt (LUCIANO et al., 2002; PERES et al., 2005; ROPELLE et al., 2006). Por outro lado, a ingestão de dieta rica em lipídeos é associada com uma redução na captação de glicose em diferentes tecidos, caracterizado pela redução na sensibilidade à insulina no fígado, músculo, hipotálamo, mas não em tecido adiposo, pelo menos durante o primeiro mês de dieta hiperlipídica (PRADA et al., 2006). Nosso laboratório, em recente estudo, mostrou que no tecido adiposo de animais

alimentados com dieta hiperlipídica, à redução na sinalização da insulina, através da fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-3, e a ausência de qualquer alteração na via IRS-2/Akt contrasta com a habilidade da insulina em estimular a via CAP/Cbl/C3G em tecido adiposo (PRADA et al., 2006). Sendo que, a ativação desta última via resulta em um acréscimo de tecido adiposo corpóreo. Assim, sugere-se, que a diferença na sinalização da insulina (via PI 3-quinase/Akt) e da via CAP/Cbl/C3G em adipócitos de animais sedentários e destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídeos pode explicar a diferença de acúmulo de gordura epididimal entre esses grupos.

Nossos dados mostram que após 8 semanas de ingestão da dieta hiperlipídica, ambos os grupos S-DHL e D-DHL tiveram uma redução na taxa de desaparecimento da glicose avaliada pelo teste de tolerância à insulina quando comparados aos animais controles. No entanto, observa-se que os ratos D-DHL foram menos responsivos à insulina do que os ratos S-DHL. É possível que essa menor responsividade à insulina esteja relacionada com o maior acúmulo de tecido adiposo e aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL-1 β , IL-6). Kern demonstrou em experimentos com humanos que indivíduos obesos apresentam um aumento na expressão de TNF e após a redução de peso corporal há uma diminuição de TNF e conseqüente melhora da sensibilidade periférica à insulina (Kern 1995). No entanto, tal hipótese deve ser melhor investigada e novas considerações deverão surgir para esclarecer o assunto.

Na tentativa de encontrar respostas para o maior acúmulo de tecido adiposo epididimal e rápido ganho de peso nos animais destreinados, avaliou-se as vias moleculares IRS/PI 3-q/Akt e CAP/Cbl em adipócitos, ambas importantes na captação de glicose. Nota-se, uma diminuição na fosforilação em tirosina induzida por insulina do IR, que foi acompanhada pelo decréscimo na fosforilação em tirosina do IRS-1, IRS-2 e da associação IRS-1/PI 3-quinase, IRS-2/PI 3-quinase, resultando em uma diminuição na fosforilação em serina da Akt nos animais S-DHL e D-DHL em relação aos grupos controles do nosso experimento. Surpreendentemente, verifica-se, que a diminuição do sinal da insulina foi mais acentuada entre os animais sedentários que receberam a dieta rica em lipídeos quando comparados aos animais destreinados. Tal dado oferece a primeira evidencia para explicar o acréscimo mais acentuado de gordura epididimal nos animais D-DHL com relação aos S-DHL, já que a entrada de energia (glicose) nos adipócitos pode então ser convertida e armazenada na forma de triacilgliceróis. Assim, a maior

sensibilidade a insulina dos animais D-DHL em relação aos animais S-DHL, constatada através da via IRSs/PI 3-quinase/Akt, possivelmente favoreceu a entrada dessa hexose e conseqüente acúmulo de triglicérides no tecido adiposo. Peres e colaboradores, demonstraram, que o treinamento físico aeróbio realizado em esteira num período de 7 semanas, aumenta a responsividade à insulina em adipócitos isolados através da via IRS/PI 3-quinase/Akt (PERES et al., 2005). No entanto, o autor verificou, que tal modulação ocorreu logo após 24 horas da última sessão de exercício físico e em nosso estudo constatamos que esse comportamento persiste por mais tempo, e isso parece colaborar com o acréscimo maior de tecido adiposo epididimal nos animais destreinados alimentados com a dieta hiperlipídica.

Além disso, observa-se um aumento na fosforilação induzida por insulina da proteína Cbl, e em paralelo ocorreu o aumento na associação da CAP/Cbl como também um aumento na expressão de CAP e Cbl no tecido adiposo dos ratos S-DHL e D-DHL. Houve também, um aumento na fosforilação em tirosina induzida por insulina da proteína C3G desses animais. No entanto, ocorreu significativo aumento na expressão e fosforilação dessas proteínas acima descritas nos animais do grupo D-DHL quando comparados aos ratos sedentários. Portanto, esta maior sensibilidade nas etapas da via de sinalização da insulina com a habilidade da insulina em estimular a via CAP/Cbl/C3G no tecido adiposo dos ratos D-DHL possivelmente tenha colaborado para o maior acúmulo de gordura após a cessação do treinamento físico. Prada e colaboradores observaram que ratos sedentários alimentados com dieta rica em lipídes são resistentes à insulina, com decréscimo na ação do hormônio através da via IRS/PI 3-quinase/Akt em tecido adiposo. No entanto, a habilidade da insulina em estimular a captação de glicose pela via CAP/Cbl/C3G é mantida, o que explica o aumento da gordura epididimal desses animais por longos períodos. (PRADA et al., 2006).

Considerando os achados da literatura, nossos dados suportam a hipótese de que uma dieta rica em lipídes promove alterações deletérias à ação da insulina, causando resistência periférica ao hormônio. Em nosso modelo experimental, animais destreinados são menos responsivos à insulina do que animais sedentários quando submetidos a uma dieta hiperlipídica. Tal fato pode estar associado à produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL-6 no tecido adiposo. No entanto, como não investigamos a ação desses mediadores químicos em nosso estudo, sugerimos que tal hipótese deva ser melhor investigada para que se obtenha resultados mais conclusivos sobre o assunto. Já no tecido

adiposo branco, observa-se que apesar de uma diminuição na sinalização da insulina através da via IRS/PI 3q/Akt nos animais submetidos a dieta hiperlipídica, os animais destreinados são mais responsivos do que os animais sedentários e este fato possivelmente tenha colaborado na aquisição de massa adiposa, já que a glicose pode ser convertida e armazenada na forma de triacilgliceróis. Além disso, no que diz respeito à via CAP/Cbl, observa-se que a mesma permanece responsiva após 2 meses da ingestão de uma dieta rica em lipídes. Interessantemente, os animais destreinados parecem ter essa via mais preservada. Este novo achado sugere que o ganho de peso e a rápida aquisição de tecido adiposo com o destreinamento físico, possam no mínimo em parte ser resultante da maior responsividade da via CAP/Cbl/C3G. Isso, conseqüentemente, favorece o desenvolvimento da obesidade, que parece agravar a resistência à insulina e em longo prazo pode evoluir para o diabetes do tipo 2.

Conclusão

A cessação do exercício físico resulta em rápido acréscimo de gordura e ganho de peso corporal independentemente de mudanças na ingestão alimentar dos ratos. Tais adaptações deve-se no mínimo em parte a maior responsividade à insulina observada através da via IRSs/PI 3-quinase e principalmente da habilidade da insulina em estimular a via CAP/Cbl em tecido adiposo epididimal de animais destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídes.

Referências

- ALMÉRAS N.; LEMIEUX S.; BOUCHARD C.; TREMBLAY A. Fat gain in female Swimmers. **Physiological Behavior**, v.61, p.811-917, 1997.
- APLEGATE, E.A.; STERN J.S. Exercise termination effects on food intake, plasma insulin, and adipose tissue lipoprotein lipase activity in the Osborne-Mendel rat. **Metabolism**, v.36, p.709-714, 1987.
- ARCIERO P.J.; SMITH D.L.; CALLES-ESCADON J. Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. **Journal of Applied Physiology**, v.84, p.1365-1373, 1998.
- BASSUK S.S.; MANSON J.E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Journal of Applied Physiology**, v.99, p.1193-1204, 2005.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72 p.248-254, 1976.
- BRAUMANN C.A.; RIBON V.; KANZAKI M.; THURMOND D.C.; MORA S.; SHIGEMATSU S et al. CAP

- defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v.407, p.202-207, 2000.
- CHIANG S.H.; BAUMANN C.A.; KANZAKI M.; THURMOND D.C.; WATSON R.T.; NEUDAUER C.L et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, 410; 944-948, 2001.
- ECKEL R.H.; YOST T.J. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. **Journal of Clinical Investigation**, v.80, p. 992-997, 1987.
- GOODYEAR, L.J.; KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Journal of Biochemistry**, v.49, p.235-261, 1998.
- GIADA F.; VIGNA G.B.; VITALE E.; BALDO-ENZI G.; BERTAGLIA M.; CRECCA R.; FELLIN R. Effect of age on the response of blood lipids, body composition, and aerobic power to physical conditioning and deconditioning. **Metabolism**, v.44, p.161-165, 1995.
- HOUWARD J.A.; SHINEBARGER M.H.; DOLAN P.L.; LEGGET-FRAZIER N.; BRUNER R.K.; McCammon M.R.; ISRAEL R.G.; DOHN GL. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, v.264, p.896-901, 1993.
- KRISKA A.M.; LAPORTE R.E.; PETTIT D.J.; CHARLES M.A.; NELSON R.G.; KULLER L.H.; BENETT P.H.; KNOWLER W.C. The association of physical activity with obesity, fat distribution and glucose intolerance in Pima Indians. **Diabetologia**, v.36, p.863-869, 1993.
- KERN P.A. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal Clinical Investigation**, v.95, p.2111-2119, 1995.
- LAMBERT E.V.; WOODING G.; LAMBERT M.I.; KOESLAG J.H.; NOAKES T.D. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. **Journal of Applied Physiology**, v.77, p.2564-2571, 1994.
- LUCIANO E.; CARNEIRO E.M.; CARVALHO CR.; CARVALHEIRA JB.; PERES SB.; REIS MA.; SAAD MJ et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal Applied Physiology**, v.147, p.149-157, 2002.
- MAYER-DAVIS EJ.; D'AGOSTINO R JR.; KARTER AJ.; HAFFNER SM, REWERS MJ.; SAAD M.; BERGMAN R.N. Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the insulin Resistance Atherosclerosis Study. **JAMA**, v.279, p.669-674, 1998.
- PATTI M.E.; KAHN C.R. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v.9, p.89-109, 1998.
- PERIZKOVA J. Body fat and Physical Fitness. The Hague: Nijhoff, 1977.
- PESSIN J.E.; SALTIEL A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.165-169, 2000.
- PRADA P.O.; PAULI J.R.; ROPELLE E.R.; ZECCHIN H.G.; CARVALHEIRA J.B.C.; VELLOSO L.A.; SAAD M.J.A. Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. **FEBS Letters**, v.580, p.4889-4894, 2006.
- RIBON V.; SALTIEL A.R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical Journal**, 273: 4073-4080, 1997.
- RIBON V.; HERRERA R.; KAY B.K.; SALTIEL A.R. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. **Journal Biological Chemistry**, v.273, p.4073-4080, 1998.
- SALTIEL A.R.; KAHN C.R. Insulin signaling and regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414 p.799-806, 2001.
- ROPELLE E.R.; PAULI J.R.; PRARA P.O.; DE SOUZA C.T.; FARIA M.C.; PICARDI P.K.; SAAD M.J.A. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise: the role of PTP-1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of Physiology**, v.12, p.1-11, 2006.
- SCHEMMELE R.; MICKELSEN O.; GILL J.L. Dietary obesity in rats: body weight and body fat accretion in seven strains of rats. **Journal of Nutrition**, v.100, p.1041-1048, 1970.
- PERES S.B.; DE MORAES S.M.F.; COSTA C.E.M.; BRITO L.C.; TAKADA J, ANDREOTTI S. et al. Endurance exercise increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-Kinase/Akt pathway. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1037-1043, 2005.
- WALBERG J.L.; GREENWOOD M.R.C.; STERN J.S. Lipoprotein lipase activity and lipolysis after swim training in obese Zucker rats. **American Journal Physiology Regulatory Comparative Physiology**, v.245, p.R706-R712, 1983.
- WHITE M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular Cell Biochemistry**, v.182, p.3-11, 1998.

Endereço:

Laboratório de investigação dos mecanismos moleculares de sinalização da insulina, FCM/Unicamp
José Rodrigo Pauli
Rua Zeferino Vaz s/nº, Cidade Universitária
Campinas SP
13084-971
Tel: (19) 35218950, FAX: (19) 35218950
e-mail: rodrigose@yaho.com.br