UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

INFLUÊNCIA DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBIO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS.

FABIO CARVALHO BERGAMO

SÃO PAULO
2010

INFLUÊNCIA DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBIO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS.

FÁBIO CARVALHO BERGAMO

Dissertação apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da Universidade
de São Paulo, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Educação
Física.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr.^a. FABIANA DE SANT'ANNA EVANGELISTA

Bergamo, Fábio Carvalho

Influência do gene da enzima conversora de angiotensina sobre as respostas metabólicas induzidas pelo treinamento físico aeróbio em camundongos diabéticos / Fábio Carvalho Bergamo. – São Paulo : [s.n.], 2010.
xiii, 84p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte
da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana de Sant'Anna Evangelista.

1. Diabetes Experimental 2.Sistema Renina Angiotensina 3.Treinamento Físico I.
Título.

*Dedico aos meus pais e à
minha avó Helena, pelo apoio
incondicional desde o primeiro momento
para realização desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, proteção e energia para enfrentar os momentos dessa longa caminhada, a vida.

À Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista pela oportunidade, ensinamentos, paciência e, acima de tudo, pelo exemplo de luta e determinação. Sem os quais a realização deste não seria possível.

À Profa. Dra. Miriam Helena Fonseca Alaniz pelos ensinamentos e disponibilidade constante durante todo o processo, principalmente nas avaliações envolvendo o tecido adiposo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger por colocar seu laboratório à disposição em tempo integral, possibilitando a realização do presente trabalho.

À Talita Sayuri Higa pela grande colaboração em todos os processos desse trabalho.

À Aline Villa Nova Bacurau pela colaboração nas avaliações envolvendo o músculo esquelético.

Aos amigos de laboratório, Jaqueline, Acauã e Flávio pela colaboração na realização desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório Leandro, Newton e Mônica pela disponibilização e cuidado com os animais.

A todos os amigos da EEFE-USP, da divisão de experimentação e Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor-SP que certamente contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

À Ilza, Márcio e Luiz da secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, sempre atentos e solícitos no atendimento ao aluno.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	6
2.1 Objetivo Geral	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Diabetes	7
3.2 Sistema Renina Angiotensina	11
3.3 Diabetes e Sistema Renina Angiotensina	14
3.4 Adaptações metabólicas ao treinamento físico	16
3.5 O modelo experimental	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Amostra	21
4.2 Modelo de camundongos geneticamente modificados	22
4.3 Planejamento dos cruzamentos dos camundongos com 1 a 4 cópias do gene da ECA	22
4.4 Identificação dos animais	23
4.5 Genotipagem	23
4.6 Indução do Diabetes Experimental	24
4.7 Treinamento Físico	25
4.8 Avaliação da capacidade de esforço físico	25
4.9 Avaliações durante o protocolo experimental <i>in vivo</i>	26
4.9.1 Fatores determinantes do balanço energético	26
4.9.2 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)	27

4.10	Sacrifício e coleta de tecidos e sangue	27
4.11	Estudo do tecido adiposo branco	28
4.11.1	Extração dos adipócitos e análise morfológica	28
4.11.2	Avaliação da atividade lipolítica frente ao estímulo com isoproterenol	29
4.11.3	Dosagem da atividade da enzima ácido graxo sintase (FAS)	30
4.12	Estudo do músculo esquelético	31
4.12.1	Dosagem da atividade máxima da enzima citrato sintase	31
4.12.2	Reação histoquímica para Miosina ATPase e determinação da tipagem de fibras musculares	33
4.12.3	Quantificação de capilares no músculo esquelético	35
4.13	Desenho dos procedimentos experimentais	36
4.14	Análise Estatística	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Composição Corporal	38
5.2	Consumo diário de ração	43
5.3	Metabolismo energético de repouso	44
5.4	Capacidade de realização de exercício físico	45
5.5	Avaliações Bioquímicas	46
5.5.1	Glicemia de Jejum	46
5.5.2	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal	47
5.5.3	Insulina	49
5.5.4	Leptina	50
5.6	Atividade Lipolítica	50
5.7	Atividade Lipogênica	51
5.8	Avaliações músculo-esqueléticas	53
6	DISCUSSÃO	56
6.1	Influência do genótipo da ECA no desenvolvimento do diabetes experimental	56
6.2	Efeitos metabólicos do treinamento físico no diabetes experimental	61
7	CONCLUSÃO	71
8	REFERÊNCIAS	72

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Separação dos grupos de animais submetidos ao protocolo experimental	21
TABELA 2 - Ganho de peso corporal (PC) dos animais ao longo das 15 semanas de protocolo e Índice de Lee	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Loja muscular posterior após mergulhada no isopentano (A) e Congelamento das amostras em nitrogênio líquido (B)	33
FIGURA 2 - Classificação dos tipos de fibras no músculo sóleo no pH 10,3.....	35
FIGURA 3 - Identificação dos capilares no músculo sóleo	36
FIGURA 4 - Evolução do peso corporal dos animais durante o protocolo experimental	38
FIGURA 5 - Ganho de peso corporal entre semana 1 e semana 7 (A) e entre a semana 8 e semana 15 (B)	39
FIGURA 6 - Peso dos depósitos de gordura branca retroperitoneal e periepididimal (A) .Valores médios do diâmetro de adipócitos dos animais submetidos ao protocolo experimental (B)	41
FIGURA 7 - Imagens ilustrativas da quantificação do diâmetro dos adipócitos extraídos do tecido adiposo periepididimal	42
FIGURA 8 - Peso dos órgãos (A) e pesos dos músculos sóleo e gastrocnêmio (B) dos animais do protocolo experimental	43
FIGURA 9 - Consumo diário de ração por animal avaliado durante a sem 1 à sem 7 (A) e a sem 8 à sem 15 (B)	44
FIGURA 10 - Consumo de oxigênio (VO ₂) de repouso dos animais submetidos ao protocolo experimental pré e pós treinamento físico	45
FIGURA 11 - Distância (A) e Tempo (B) avaliados no teste de esforço progressivo em esteira até exaustão realizado pré e pós-treinamento físico	46
FIGURA 12 - Glicemia de jejum obtida após o sacrifício	47
FIGURA 13 - Glicemia avaliada no teste de tolerância à glicose e área sob a curva (AUC) pré-treino (A) e pós-treino (B)	48
FIGURA 14 - Concentração de insulina sérica após o período de treinamento físico ..	49
FIGURA 15 - Concentração de leptina sérica após o período de treinamento físico	50
FIGURA 16 - Atividade lipolítica (A) e diferença entre as taxas de glicerol na presença (Iso) e na ausência (Basal) de isoproterenol (B) em adipócitos de animais submetidos ao protocolo experimental	51

FIGURA 17 - Atividade da enzima lipogênica ácido graxo sintase (FAS) no tecido adiposo retroperitoneal	52
FIGURA 18 - Atividade da enzima lipogênica ácido graxo sintase (FAS) no tecido hepático	52
FIGURA 19 - Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo	53
FIGURA 20 - Percentual de fibras musculares tipo I (A), Intermediárias (B) e tipo IIA (C) no músculo sóleo	54
FIGURA 21 - Densidade de fibras no músculo sóleo inteiro	55
FIGURA 22 - Razão número de capilares por número de fibras no músculo sóleo inteiro	55

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

1S	1 Cópia da Enzima Conversora de Angiotensina Sedentário
1T	1 Cópia da Enzima Conversora de Angiotensina Treinado
3S	3 Cópias da Enzima Conversora de Angiotensina Sedentário
3T	3 Cópias da Enzima Conversora de Angiotensina Treinado
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATP	Trifosfato de Adenosina
AUC	Área Sob a Curva
CS	Citrato Sintase
DM 1	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
eNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
EP	Tecido Adiposo Periepididimal
FAS	Ácido Graxo Sintase
G6PDH	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
Gastro	Gastrocnêmio
iECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
I/D	Inserção/Deleção
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RP	Tecido adiposo retroperitoneal
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SRA	Sistema Renina Angiotensina
STZ	Estreptozotocina
VO ₂	Consumo de Oxigênio

RESUMO

INFLUÊNCIA DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS INDUZIDAS PELO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBIO EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Autor: FABIO CARVALHO BERGAMO

Orientador: PROF^a. DR^a. FABIANA DE SANT'ANNA EVANGELISTA

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do treinamento físico (TF) sobre as alterações do metabolismo energético induzidas pelo diabetes em camundongos com 1 e 3 cópias do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA). Para isso, camundongos machos C57BL/6 geneticamente modificados com 1 e 3 cópias do gene da ECA foram induzidos ao diabetes por estreptozotocina (STZ), e separados em 4 grupos de acordo com a realização ou não de TF com natação: 1 cópia sedentário (1S, n=14), 1 cópia treinado (1T, n=15), 3 cópias sedentário (3S, n=10), e 3 cópias treinado (3T, n=11). Os principais resultados foram: não houve diferença no ganho de peso corporal, porém o peso do depósito de gordura retroperitoneal e diâmetro de adipócito foram menores no grupo 3T comparado ao 1S, 1T e 3S; menor consumo de ração diária do 1S comparado ao 1T, 3S e 3T; maior consumo de oxigênio de repouso do 3S comparado ao 1T e 3T; melhor capacidade de realizar exercício físico e menor glicemia de jejum do 1T comparado ao 1S e 3S (1T=305±34 vs. 1S=479±47 e 3S=496±49 mg/dl); maior concentração de leptina no 1T comparado ao 1S (1T=5,65±0,33 vs 1S=4,07±0,43 ng/ml)

e maior atividade lipolítica no 1T comparada aos grupos 1S, 3S e 3T (1T=288±50 nmol/10⁶cels/h vs. 1S=79±37, 3S=123±37 e 3T=50±20 nmol/10⁶cels/h); Não houve diferença estatística entre os grupos na tolerância à glicose, na atividade da enzima lipogênica ácido graxo sintase, na atividade da enzima citrato sintase, na tipagem de fibras e na razão capilar/fibra muscular do músculo sóleo. Esses resultados demonstraram que as adaptações metabólicas promovidas pelo TF no diabetes são parcialmente associadas ao genótipo da ECA.

Palavras-chave: diabetes experimental, sistema renina angiotensina, metabolismo energético, treinamento físico.

ABSTRACT

INFLUENCE OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME GENE ON METABOLIC
RESPONSES INDUCED BY AEROBIC PHYSICAL TRAINING IN DIABETIC
MICE

Author: FABIO CARVALHO BERGAMO

Advisor: PROF^a. DR^a. FABIANA DE SANT'ANNA EVANGELISTA

The main purpose of this study was to evaluate the effects of physical training (PT) on changes in energy metabolism induced by diabetes in mice harboring 1 and 3 copies of angiotensin converting enzyme (ACE) gene. For this, transgenic adult male mice (C57BL/6) with 1 or 3 copies of ACE gene were induced to diabetes by Streptozotocin (STZ) and separated into groups sedentary or physical trained with swimming: 1 copy sedentary (1S, n = 14), 1 copy trained (1T, n = 15), 3 copies sedentary (3S, n = 10) and 3 copies trained (3T, n = 11). The main results were: body weight gain was not different among groups, but 3T group reduced retroperitoneal fat pad and adipocyte diameter compared to 1S, 1T and 3S groups; daily food intake was lower in 1S compared to 1T, 3S and 3T groups; resting oxygen uptake was higher in 3S compared to 1T and 3T; physical exercise ability increased and fasting glucose decreased only in 1T group compared to 1S and 3S (1T=305±34 vs. 1S=479±47 e 3S=496±49 mg/dl); serum leptin increased in 1T compared to 1S (1T=5,65±0,33 vs 1S=4,07±0,43 ng/ml), and lipolytic activity was higher in 1T compared to 1S, 3S and 3T

groups (1T=288±50 nmol/10⁶cels/h vs. 1S=79±37, 3S=123±37 e 3T=50±20 nmol/10⁶cels/h). There were no statistical differences among groups in glucose tolerance, lipogenic activity of fat acid synthase, activity of citrate synthase enzyme, fibre type composition and capillary-to-fibre ratio of soleous muscle. These results demonstrated that metabolic adaptations promoted by PT in diabetes are partially associated with ACE genotype.

Keywords: experimental diabetes, renin-angiotensin system, energy metabolism, physical training.