RENATA MATIELLO

Expressão do Coativador-1 α do *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* (PGC-1 α) em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris de ratos machos Wistar submetidos ao exercício físico voluntário crônico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2009

RENATA MATIELLO

Expressão do Coativador-1 α do *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* (PGC-1 α) em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris de ratos machos Wistar submetidos ao exercício físico voluntário crônico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Rosa Ferreira dos Santos

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

Ao meu querido marido LEANDRO FERREIRA, amigo e companheiro por me apoiar com tanto carinho o meu crescimento pessoal, profissional e científico. Acho que vou melhorar o humor e estress. Eu te amo !!!

Aos meus pais VALENTIM e MARLENE por serem minha base e firme alicerce em todos os momentos. Ao meu querido pai pelo constante carinho e à minha querida mãe pela preocupação com meu bem estar.

Aos meus irmãos MARCELO, CLAUDIA e DANIELA, pelo carinho e apoio que sempre me deram e ainda darão em toda minha vida. Aos sobrinhos MARCELLI, BIANCA e GUILHERME pelo orgulho da tia.

E não menos importante aos cunhados ANDRÉIA, LUCIA, SÉRGIO e PRISCILA e aos sogros OSWALDO E ANTONIA pela paciência e ajuda em todas essas etapas.

À todos, o meu constante amor e agradecimento ! Amo vocês !!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu consolo, refúgio e força... agradeço pelo milagre fantástico da vida !

Em especial à Doutora ROSA FERREIRA DOS SANTOS, por ter me aceito como sua aluna. Pelo exemplo de pessoa e orientadora e pelo primor científico com que guia seus passos. Muito obrigada !

À Doutora MARIA ELIZABETH ROSSI DA SILVA pelo apoio e competência na liderança do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio – LIM 18.

À Doutora DALVA MARREIRO ROCHA, um grande ser humano e mestre, que me apoiou, incentivou e sempre confiou em mim. Nunca vou esquecer !

Agradeço à ROSA T. FUKUI, minha orientadora psicológica que sempre me deu forças nos momentos em que pensei em desistir. Agradeço também pela orientação na "bancada", pela paciência e colaboração fundamental nesse projeto.

À Doutora BERENICE BILHARINHO MENDONÇA, pela colaboração no início do projeto e por sua capacitação científica para liderar o Depto. de Endocrinologia.

Aos técnicos WALTER CAMPESTRE, GRECI DA SILVA PAULA e, principalmente, à minha inesquecível "secretária" MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES SANCHES, pela paciência e dedicação nos cuidados aos animais que participaram desse estudo.

Às colegas ARITÂNIA DA SILVA SANTOS e FERNANDA BECK ROSSI pela ajuda nas determinações sorológicas.

Às colegas ADRIANA ROSA e JESSICA PEREIRA FORES pelo companheirismo e a amizade em todos esses anos no LIM 18.

À ANA IOCHABEL S. MORETTI do LIM 51 FMUSP pela disponibilidade, atenção e ajuda, cujas sugestões foram fundamentais em meu projeto.

Ao LEONARDO DOS REIS SILVEIRA, Jovem Pesquisador da UNICAMP, pela sua atenção e disponibilidade em me ajudar no desenvolvimento de técnicas.

Agradeço à todos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências ICB-I da USP por me acolher em seus laboratórios, em especial ao Doutor RUI CURI e Doutora CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO.

Um enorme abraço aos meus novos amigos do Laboratório de Sinalização Intracelular onde desenvolvi a técnica de Western Blot. À técnica LUCIENE RIBEIRO (TECA) pela simpatia e bom humor, pela disponibilidade com que se propunha a ajudar e pelas “dicas” em relação à realização da técnica. Aos alunos ANDERSON MARÇAL, FELIPE NATALI, JOÃO PAULO e MÁRIO FILHO. Poder escolher uma música e ver vocês dançando foi realmente muito divertido !

Ao meu grande amigo THIAGO REDIGULO que esteve presente na área de informática e compartilhou de todas as minhas alegrias e tristezas. “ Ascendeu ! ”

Aos amigos WILSON, ANNA RAQUEL, MARLI e TÁRSIO, pelo apoio na concretização desse sonho.

À FAPESP pela concessão da minha bolsa de estudos e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

À todos e também para aqueles que não citei, mas também foram muito importante na realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA !

***É preciso ter um caos dentro de si para dar
a luz uma estrela cintilante.***

(Friedrich Nietzsche)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Conexão com o meio ambiente	1
1.3 Biogênese mitocondrial e expressão gênica modulada pela PGC-1 α	2
1.4 Papel da PGC-1 α na homeostase glicêmica	4
1.4.1 Músculo esquelético	4
1.4.2 Fígado	5
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	11
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1 – Ratos	15
5.2 – Dietas	16
5.3 – Exercício físico voluntário em roda de atividade (sem motor elétrico).....	17
5.4 – Bomba de Infusão Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas	18
5.5 – Variáveis e Métodos Bioquímicos	19
5.5.1 – Coleta de sangue	19
5.5.2 – Glicose	19
5.5.3 – Insulina	19
5.5.4 – Ácidos graxos livres	20
5.5.5 – Hematócrito	20
5.6 – Avaliação da sensibilidade à insulina	20
5.6.1 – Jejum e anestesia	21
5.6.2 – Implantação da cânula venosa	21
5.6.3 – Preparo do infusato	22
5.6.4 – Infusão da glicose e insulina	22
5.7 – Obtenção dos tecidos	23
5.8 – Preparação dos extratos protéicos	24
5.9 – Análise por Western Blot	25
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28

7. RESULTADOS	
7.1 – Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais	30
7.2 – Exercício Físico	31
7.3 – Determinações bioquímicas	32
7.3.1 – Glicemia de jejum	32
7.3.2 – Insulinemia de jejum	32
7.3.3 – Ácidos graxos livres de jejum	32
7.4 – Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas	33
7.5 – Western Blot	34
7.5.1 – Fígado	34
7.5.2 – Músculo esquelético soleus	34
7.5.3 – Músculo esquelético plantaris	34
8. DISCUSSÃO	38
9. CONCLUSÃO	43
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
11. APÊNDICE	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	ácidos graxos livres
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área sob a curva
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
COX	citocromo C oxidase
DM1	Diabetes Melito tipo 1
DM2	Diabetes Melito tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão médio
Ex	grupo exercício
FOXO1	forkhead box O1
GLI	glicemia
GLUT4	transportador de glicose 4
INS	insulinemia
IRS-1	substrato do receptor de insulina 1
mtDNA	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mtTFA	fator A de transcrição mitocondrial
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
N ₂	nitrogênio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEFA	ácidos graxos não-esterificados
NRF	fator de respiração nuclear
OXPHOS	oxidação fosforilativa

p38MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGC-1	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-1</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-1α</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
RI	resistência à insulina
RIE	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucleico
Sd	grupo sedentário
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese do gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TA	termogênese adaptativa
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TBS-T	tampão tris-salina com tween
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSGIE	teste de supressão da glicose e insulina endógenas
UA	unidades arbitrárias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Termogênese Adaptativa	2
Figura 2 – Biogênese mitocondrial e expressão gênica através da PGC-1α	3
Figura 3 – Papel da PGC-1α na resistência à insulina e Diabetes Mellitus tipo 2..	9
Figura 4 – Roda de atividade sem motor elétrico	18
Figura 5 – Dissecção completa do animal para obtenção dos tecidos	24
Figura 6 – Médias $\pm$ EPM das distâncias percorridas diariamente (km / dia), em cada semana, pelos ratos do grupo Exercício	31
Figura 7 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais das Áreas sob as Curvas de Glicose e Insulina	33
Figura 8 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais (UA) do conteúdo de proteína PGC-1α analisado pelo Western Blot em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário	35
Figura 9 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais do conteúdo de proteína PGC-1α (UA) analisado pelo Western Blot em diferentes tecidos	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais dos pesos (g) de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário 30

Tabela 2 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais do consumo alimentar diário de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário. 30

Tabela 3 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio da distância percorrida (km/dia) pelos ratos do grupo Exercício 31

Tabela 4 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais de glicose (mg/dl), insulina (ng/ml) e ácidos graxos livres (mEq/l) de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário 32

Tabela 5 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais das Áreas sob a Curva de Glicemia (mg / dl / min) e Insulina (ng / ml / min), durante o Teste de Supressão de Glicose e Insulina Endógenas de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário 33

Tabela 6 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais do conteúdo de proteína PGC-1 α (UA) analisado pelo Western Blot, em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris, de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário 34

RESUMO

MATIELLO, R. **Expressão do Coativador-1 α do *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* (PGC-1 α) em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris de ratos machos Wistar submetidos ao exercício físico voluntário crônico.** São Paulo, 2009. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: A “*Peroxisome Proliferator – Activated Receptor- γ - Coactivator 1*” (PGC-1 α e β) é proteína responsável pela conexão entre estímulos ambientais e resposta metabólica celular. Sua presença é importante em tecidos adiposo, hepático e muscular esquelético e, em animais, em tecido adiposo marrom. Interage com receptores nucleares modulando a biogênese mitocondrial e mantendo o equilíbrio termo energético celular com o meio ambiente. A redução da expressão de PGC-1 α e da oxidação fosforilativa tem sido associada à resistência à insulina em doenças como Diabetes Mellitus tipo 2 e Síndrome Metabólica. **OBJETIVOS:** Avaliar o efeito do exercício na expressão da PGC-1 α em tecidos alvos da insulina, como o fígado e músculos esqueléticos soleus (SOL) e plantaris (PLA) de ratos machos Wistar e correlacioná-lo com a sensibilidade à insulina. **METODOLOGIA:** Ratos machos Wistar 190 $\pm$ 15 g, n = 24, randomizados em 2 grupos: Ex (exercício físico) e Sd (sedentário) colocados respectivamente, em roda de atividade ou gaiolas comuns durante cinco semanas. Ao final do período, após jejum de quatro horas, foi colhido sangue para dosagens de glicose (GLI), insulina (INS) e ácidos graxos livres (AGL) e, em seguida, foram submetidos ao Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas com infusão durante 180 minutos de solução GLI (20mg/kg/min) + INS (5 mU/kg/min); amostras de sangue foram colhidas aos 140, 150, 160, 170 e 180 minutos. Terminado o teste e ainda sob anestesia, foram retirados os tecidos: fígado (FG) e músculos esqueléticos (PLA e SOL), os quais foram imediatamente congelados e mantidos a -70°C para posteriores análises. A expressão da PGC-1 α foi avaliada pelo Western Blot com anticorpo policlonal anti-PGC-1. Análise estatística por *teste t Student não-pareado* e nível de significância 5%. **RESULTADOS:** Os dados se referem à média e erro padrão médio dos valores individuais das amostras. A distância percorrida na última semana (km/dia) pelo grupo Ex foi eficaz (5,61 $\pm$ 0,67). Não houve diferença no peso (g) dos ratos entre

os grupos Ex e Sd ($355,85 \pm 9,51$ x $375,68 \pm 5,30$) NS. Os valores de GLI jejum (mg/dl) foram semelhantes entre os grupos ($117,6 \pm 3,7$ x $122,4 \pm 2,6$) NS. Entretanto, INS e AGL foram menores no grupo Ex: INS (ng/ml) ($0,68 \pm 0,12$ x $1,45 \pm 0,14$) $p < 0,001$ e AGL (mEq/L) ($1,12 \pm 0,11$ x $1,60 \pm 0,11$) $p < 0,006$. Durante o teste de supressão, os valores de GLI e INS na fase de estabilidade foram semelhantes entre grupos (expressos em área sob a curva): AUC GLI (mg/dl/min) ($2,77 \pm 0,12$ x $2,95 \pm 0,07$) NS; AUC INS (ng/ml/min) ($0,81 \pm 0,15$ x $0,99 \pm 0,09$) NS. A expressão da PGC-1 α foi maior no PLA de ratos do grupo Ex e, em FG e SOL foi semelhante entre os grupos. **CONCLUSÃO:** O exercício físico durante 5 semanas em roda de atividade voluntária, aumentou a sensibilidade à insulina e a oxidação de ácidos graxos livres no jejum. A melhora da sensibilidade à insulina esteve associada à maior expressão da PGC-1 α somente em músculo PLA. Estes dados sugerem que o aumento da sensibilidade à insulina no jejum não se relacionou com o aumento da expressão da PGC-1 α em outros tecidos alvos da ação insulínica, como FG e SOL, neste modelo de estudo .

Descritores: PGC-1 α , músculo esquelético plantaris, músculo esquelético soleus , exercício físico , roda de atividade , resistência à insulina .

SUMMARY

MATIELLO, R. **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ - Coactivator-1 α (PGC-1 α) expression in the liver and skeletal muscles soleus and plantaris of male Wistar rats subjected to chronic voluntary exercise.** São Paulo, 2009. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUCTION: The *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ - Coactivator 1* (PGC-1 α e β) is a protein responsible for the connection between environmental stimuli and cell metabolic response. Its presence is important in fat tissue, hepatic and skeletal muscle and in animals on brown fat tissue. Interact with nuclear receptors modulating the mitochondrial biogenesis and maintain thermal energy balance with the environment. Diminished of PGC-1 α expression and oxidative phosphorylation has been associated to insulin resistance in diseases like Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. **OBJECTIVES:** To evaluate the effects of exercise on the PGC-1 α expression in target tissues of insulin, such as liver and skeletal muscles soleus (SOL) and plantaris (PLA) of male Wistar rats and correlates with insulin sensitivity. **METHODOLOGY:** Male Wistar rats 190 ± 15 g, $n = 24$, divided randomly into 2 groups: Ex (physical exercise) and Sd (sedentary), respectively placed in a voluntary running wheel cage or a standard cage for five weeks. At the end of study, after fasting for 4 hours, blood was collected for measurements of glucose (GLU), insulin (INS) and free fatty acids (FFA) then the animals were submitted to Test of Suppression Endogenous Glucose and Insulin, with infusion during 180 minutes of solution GLU (20mg/kg/min) + INS (5mU/kg/min); blood samples was collected at 140, 150, 160, 170 and 180 minutes. Finished the test and still anesthetized, the tissues were removed: liver (LIV), skeletal muscle (SOL and PLA) that were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until analysis. The PGC-1 α expression was evaluated by Western Blotting with polyclonal antibody anti-PGC-1. Statistical analysis by *unpaired Student's t test* with significance level 5%. **RESULTS:** the data refer to the mean and standard error of individual values. The distance covered per day during last week (km / day) by Ex group was efficient ($5,61 \pm 0,67$). There was no difference in weight (g) of rats between Ex and Sd groups ($355,85 \pm 9,51$ x $375,68 \pm 5,30$) NS. The values of fasting GLU were

similar between groups (mg/dl) ($117,6 \pm 3,7$ x $122,4 \pm 2,6$) NS. However INS and FFA were lower in group Ex: INS (ng/ml) ($0,68 \pm 0,12$ x $1,45 \pm 0,14$) $p < 0,001$ and FFA (mEq/L) ($1,12 \pm 0,11$ x $1,60 \pm 0,11$) $p < 0,006$. During the suppression test the values of GLU and INS on stability step were similar between groups (expressed in area under curve): AUC GIU (mg/dl/min) ($2,77 \pm 0,12$ x $2,95 \pm 0,07$) NS; AUC INS (ng/ml/min) ($0,81 \pm 0,15$ x $0,99 \pm 0,09$) NS. The PGC-1 α expression was greater in PLA of rats Ex than Sd group, and there was no difference in LIV and SOL between groups. **CONCLUSION:** The physical exercise during five weeks in voluntary running wheel increased the insulin sensitivity and fasting free fatty acids oxidation. The improvement of insulin sensitivity was associated with higher PGC-1 α expression on PLA muscle only. These data suggest that increasing insulin sensibility on fasting is not associated with increasing of the PGC-1 α expression in others targets tissues of insulin action, such as LIV and SOL, in this study model.

Descriptors: PGC-1 α , skeletal plantaris muscle, skeletal soleus muscle, physical exercise, voluntary wheel running, insulin resistance.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O equilíbrio energético entre o meio ambiente e o metabolismo celular é realizado através de vias nervosas e hormonais. Os estímulos externos chegam às células pela ativação de cadeias de sinalização intra-celular em reação tipo “cascata”, transmitindo mensagens a fatores relacionados à transcrição de genes que codificam enzimas relacionados à termogênese adaptativa (1). Entre as proteínas que fazem parte dessas cadeias de sinalização, tem sido alvo de especial interesse na última década, a “*Peroxisome Proliferator – Activated Receptor- γ - Co-activator 1*” (PGC-1).

A PGC-1 foi descrita inicialmente por Bruce Spiegelman em 1998 (2), como coativadora dos receptores nucleares PPAR γ . Ao interagir com os mesmos, promove o aumento de DNA mitocondrial, a transcrição de genes das enzimas da cadeia respiratória e homeostase energética (2). Está localizada no núcleo celular, tem peso molecular de 90 kDa, é expressa principalmente em músculos esquelético, cardíaco, fígado e, em animais, no tecido adiposo marrom (1 , 2 , 7). Estudos em animais de laboratório demonstraram que, a exposição ao frio (4° C) e a ingestão de alimentos estimulam a expressão do mRNA da PGC-1 em músculo esquelético e em tecido adiposo marrom, mas o jejum inibe sua expressão (1 , 2).

1.2 Conexão com o meio ambiente

A manutenção do equilíbrio energético com o meio ambiente é feito pela *termogênese adaptativa* (TA), mecanismo que regula a dissipação de calor do organismo em resposta aos estímulos ambientais e endógenos (1). Variações de temperatura, estímulos nutricionais, exercício físico, jejum, febre, stress entre outros, ativam mecanismos fisiológicos para aumentar a dissipação ou produção de calor.

Fazem parte da TA a oxidação fosforilativa (OXPHOS) e a beta oxidação. A OXPHOS promove a formação de duas moléculas de ATP, a partir da oxidação de uma molécula de NADH do citosol. A beta oxidação se refere ao metabolismo de ácidos graxos, que são transportados até as mitocôndrias pela carnitina, sendo então oxidados, liberando dois fragmentos de carbono na forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), que entram para o ciclo de Krebs, produzindo enorme quantidade de ATP. O coativador PGC-1 α é um dos principais reguladores dessas reações (3).

Em pequenos animais a TA se faz principalmente no tecido adiposo marrom (TAM), que é morfológica e metabolicamente diferente do tecido adiposo branco (TAB), sendo dissipador de energia, enquanto o TAB é armazenador (4) (figura 1). Os estímulos para a termogênese adaptativa no TAM se fazem através da via adrenérgica e pelo hormônio tireoideano (5 , 6). Os receptores β -adrenérgicos e os de citocinas são fundamentais para a adaptação do organismo ao meio externo (2).

Figura 1 – Termogênese Adaptativa.

1.3 Biogênese mitocondrial e expressão gênica modulada pela PGC-1 α

Alterações de temperatura e alimentação, estimulam receptores β -adrenérgicos e situações de stress (infecções e caquexia) estimulam receptores de citocinas, ambos presentes na superfície celular. Os receptores β -adrenérgicos transmitem o sinal via cAMP, que por sua vez, se bifurca de uma lado para a proteína quinase A (PKA) e do outro para a p38 MAP quinase (p38 MAPK). Os estímulos que chegam pelos receptores de citocinas seguem via p38 MAPK. O

estímulo via PKA fosforila o fator de transcrição CREB e este, aumenta a expressão do gene da PGC-1 α , enquanto que, a via da p38 MAPK fosforila diretamente a PGC-1 α , promovendo sua ativação e estabilização. Após ativação, a primeira função da PGC-1 α é estimular a expressão dos fatores de respiração nuclear (NRF-1 e NRF-2) para, em seguida, interagir com os mesmos como coativador, estimulando

Figura 2 – Biogênese mitocondrial e expressão gênica através da PGC-1 α .
(Puigserver P. and Spiegelman B.M., 2003).

desta forma, a síntese do fator A de transcrição mitocondrial (mtTFA), o qual se desloca para a mitocôndria e aumenta diretamente a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) (1 , 7 , 20). Além dos NRF's, a PGC-1 α interage também com regiões promotoras de uma grande extensão de genes mitocondriais codificados no núcleo celular, incluindo ATP sintetase, Citocromo c oxidase (COX) subunidades II e IV e Fator A de transcrição mitocondrial (mtTFA). O aumento

crônico da respiração e termogênese adaptativa induzida pela PGC-1 α pode ser modulada pelo aumento da captação de combustível (9) (figura 2).

1.4 Papel da PGC-1 α na homeostase glicêmica

1.4.1 Músculo esquelético

Os efeitos da PGC-1 α no metabolismo da glicose tem despertado interesse em estudos da fisiopatologia do diabetes tipo 2 havendo vários relatos sobre a relação entre a taxa de oxidação mitocondrial e a captação da glicose pelo músculo (8). Um maior gasto energético requer aumento na captação e no metabolismo do combustível, portanto, o complexo PGC-1 α ao estimular a oxidação de ácidos graxos, aumenta a taxa de oxidação mitocondrial e de captação da glicose mediada pela insulina em tecidos alvos. Paralelamente ao efeito ativador sobre os fatores de respiração nuclear (NRF's) e os genes mitocondriais, a PGC-1 α estimula a expressão do GLUT-4 em músculo esquelético, contribuindo para o aumento da captação da glicose e maior sensibilidade à insulina (10).

O possível envolvimento de todos os membros da família PGC-1 α no controle do tipo de fibras do músculo esquelético é evidenciado pelas observações de que a família da PGC-1 é expressa em diferentes concentrações de acordo com o tipo de fibras muscular esquelética. A PGC-1 α é altamente expressa em fibras do tipo I e IIA e a PGC-1 β aparece mais nas fibras do tipo II B, embora não exerça papel na manutenção do equilíbrio entre meio ambiente e célula (11).

As fibras musculares esqueléticas tipo I e IIA tem capacidade oxidativa, sendo a tipo I mais oxidativa do que as fibras IIA e com maior conteúdo mitocondrial. As fibras tipo I são de contração lenta e prolongada e as fibras do tipo IIA são de contração curta e rápida. As fibras tipo IIB com pouca capacidade oxidativa e pouco

conteúdo mitocondrial são de contra curta e rápida. A expressão das isoformas da PGC-1 α em músculo esquelético varia de acordo com a predominância do tipo de fibras, sendo maior nas fibras oxidativas, como as do tipo I e IIA. Dependendo da função do músculo, sua composição tem predominância de um ou de outro tipo de fibra (12 , 13 , 14).

Devido à sua predominância em músculo esquelético e sua modulação na síntese do GLUT-4, a PGC-1 α tem sido considerada importante na manutenção da homeostase glicêmica e na promoção da ação biológica da insulina. A disfunção mitocondrial com redução na oxidação de ácidos graxos e acúmulo dos mesmos em músculo esquelético e fígado, tem sido associada à Resistência à Insulina e Síndrome Metabólica, por reduzir a captação da glicose nesses tecidos (15 , 16).

Kelley e colaboradores (20) demonstraram que a morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica do músculo esquelético de indivíduos com DM2, indivíduos obesos não diabéticos. Os indivíduos diabéticos apresentavam mitocôndrias em número menor e com volume reduzido em 35% quando comparadas aos indivíduos normais. Os indivíduos obesos apresentaram redução no número de mitocôndrias em relação aos normais, embora o volume estivesse preservado. Além do tamanho, outras diferenças morfológicas foram observadas como, deficiência na integridade da membrana estrutural (17).

1.4.2 Fígado

As concentrações de glicose no sangue são controladas pela produção hepática de glicose e pela sua captação periférica. O fígado é o maior produtor de glicose e basicamente, é através de dois mecanismos que ele mantém o equilíbrio. Um dos mecanismos é a glicogenólise através do qual, moléculas de glicogênio são

quebradas fornecendo glicose, um processo relativamente simples e rápido. O segundo mecanismo é a gliconeogênese através do qual, moléculas de glicose são sintetizadas a partir de precursores como lactato, piruvato, glicerol e alanina, tratando-se de um processo mais longo e demorado, que ocorre durante períodos de jejum prolongado. As enzimas chaves do processo de gliconeogênese são: fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose-1,6 bifosfatase e glicose-6-fosfatase, cujas funções são reguladas por hormônios como glucagon, insulina e glicocorticóides, que exercem sua função a nível de transcrição dos genes dessas enzimas (18). Acredita-se que o efeito insulínico no hepatócito se faz através do fator de transcrição FOXO1 que permite sua ligação à região promotora dos genes da gliconeogênese (15).

Estudos em camundongos mantidos com alimentação normal (*ad libitum*) demonstraram pouca expressão do mRNA da PGC-1 α em células hepáticas. Entretanto, outros autores demonstraram em camundongos mantidos em jejum, que a expressão da PGC-1 α estava aumentada (18 , 19). Foi demonstrado ainda, que a PGC-1 α esteve aumentada em fígado de camundongos com DM1 induzida por estreptozotocina e ainda aumentada em fígado de camundongos *ob/ob* portadores de DM2, mas com níveis altos de insulina devido à extrema resistência à insulina. O papel supressor da insulina sobre a expressão da PGC-1 α em fígado, foi claramente demonstrada em camundongos LIRKO, que apresentavam mutações nos receptores de insulina de hepatócitos. Nesses camundongos a expressão da PGC-1 α estava bastante aumentada (1). Considerando-se esses estudos, fica clara a importância da PGC-1 α na gliconeogênese hepática.

2. JUSTIFICATIVA

Alguns autores têm atribuído a redução da oxidação de ácidos graxos livres e seu acúmulo em músculo esquelético e fígado, à disfunção mitocondrial, levando à redução na captação da glicose e, consequente resistência à insulina e Síndrome Metabólica (15). Outros estudos em animais de laboratório têm mostrado resultados diferentes na relação expressão da PGC-1 α e ação da insulina. Em camundongos transgênicos privados de PGC-1 α , foi demonstrado aumento da sensibilidade à insulina, sugerindo um efeito diabetogênico para a PGC-1 α (21). Mais recentemente, em seres humanos demonstrou-se que a expressão da PGC-1 α apresentava-se normal em músculo esquelético de indivíduos portadores de resistência à insulina e severa disfunção mitocondrial (22).

Estas respostas aparentemente paradoxais da relação PGC-1 α e ação insulínica dificultam a interpretação de sua real função. A grande variação nas respostas se deve, provavelmente ao fato de haver diferenças entre as espécies e tecidos estudados. Entretanto, é indiscutível a importância da PGC-1 α na homeostase glicêmica e na ação insulínica no músculo, embora ainda não esteja clara sua verdadeira função em situações que interferem com a sensibilidade à insulina e as concentrações deste hormônio, assim como dos substratos que ele metaboliza como a glicose e os ácidos graxos livres.

Acreditamos que outra dificuldade na concordância de conceitos, se deve ao fato de haver poucos estudos que correlacionam função molecular da PGC-1 α com parâmetros clínicos e laboratoriais. A proposta do presente estudo é avaliar o efeito do exercício sobre a expressão da PGC-1 α em dois tipos de músculo esquelético e em fígado e correlacionar com a sensibilidade à insulina no jejum, medida pelo teste de supressão de glicose e insulina endógenas.

É bastante conhecida a ação do exercício na melhora da sensibilidade à insulina e seu efeito na captação da glicose mediada pela insulina em músculo. Já foi demonstrado que o exercício físico estimula a expressão da PGC-1 α em músculo esquelético e sabe-se que a resposta é específico ao tipo de fibra muscular. O efeito do exercício sobre a expressão da proteína PGC-1 α em fígado ainda não foi demonstrada, assim como, sua relação com a sensibilidade à insulina e expressão em músculo esquelético

Figura 3 – Papel da PGC-1 α na resistência à insulina e no Diabetes Mellitus tipo 2.

3. OBJETIVOS

O presente estudo realizado em ratos machos Wistar submetidos ao exercício físico voluntário crônico em roda de atividade voluntária durante cinco semanas, tem como objetivos:

- 1 – Demonstrar pela primeira vez o efeito do exercício na expressão da proteína PGC-1 α em fígado;
- 2 – Demonstrar o efeito do exercício na expressão da proteína PGC-1 α em músculo esquelético soleus (fibras tipo I, contração longa e lenta, rico em mitocôndrias e função oxidativa alta) e músculo esquelético plantaris (predominância de fibras tipo IIA, contração curta e rápida, função oxidativa média);
- 3 – Demonstrar o efeito do exercício sobre a sensibilidade à insulina, medida no jejum e no teste de supressão da glicose e insulina endógenas.

4. PROTOCOLLO EXPERIMENTAL

DELINEAMENTO DO ESTUDO

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 12 de abril de 2006 com Protocolo de Pesquisa nº 262/06, com financiamento obtido em 01 de dezembro de 2007 pela FAPESP, processo nº. 06/54990-8 e 07/56602-8.

5.1 – Ratos

Ratos machos da linhagem Wistar (albinos), provenientes do Centro do Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo após desmame, com peso variando entre 40 e 60 gramas, foram mantidos no Biotério do LIM 18 com controle de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{Celsius}$), com ciclos claro/escuro (12 hora dia / 12 horas noite) durante todo o estudo.

Foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas para roedores (4 animais / gaiola) com maravalhas esterilizadas de *Pinus*, sendo transferidos para novas gaiolas limpas a cada 2 dias.

Receberam água e alimentação *ad libitum*, dieta padrão por 2 semanas. Com idade de 37 dias, com peso entre 190 ± 15 gramas, foram divididos para gaiolas plásticas para roedores (1 animal / gaiola) e gaiolas de roda de atividade voluntária.

São nos primeiros 3 a 5 dias de vivência na roda de atividade, que os ratos demonstram sua habilidade para correr, por isso, é nesse período que se procede à seleção dos mesmos, sendo excluídos os inativos que não correm acima de 2,56 quilômetros ao dia (23 , 12 , 25).

O ganho de peso corporal, o consumo de água e alimento e a medida do exercício físico, foram verificados três vezes por semana durante todo o estudo, sempre nos períodos da manhã (23 , 26).

5.2 – Dietas

A dieta Nuvilab CR-1 foi fornecida pelo Centro do Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo adquiridas da empresa Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, BR. Trata-se de alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, para administração à vontade através de comedouros específicos, apresentando-se na forma peletizada (sólida). A discriminação completa da dieta padrão de manutenção Nuvilab CR-1 é baseada em recomendações do *National Research Council e National Institute of Health – USA*, como segue:

- Constituição: 22% de proteína, 55% de carboidrato, 4% de gordura e 19% de fibras e minerais.
- Composição: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivo antioxidante.
- Enriquecimento por quilograma do produto:

Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg; biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg, manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: DL-metionina 300,00 mg; lisina 100,00 mg.

Aditivos: Antioxidante 100,00 mg

5.3 – Exercício físico voluntário em roda de atividade (sem motor elétrico)

As principais vantagens da roda de atividade em relação aos outros métodos, como esteira elétrica, roda com motor elétrico ou natação, são:

- 1 – o animal permanece à vontade em seus hábitos alimentares (*ad libitum*) tendo acesso ao alimento durante o exercício, além de manter seu hábito noturno, período durante o qual percorre as maiores distâncias (23 , 12);
- 2 – o exercício na roda de atividade desenrola-se mais facilmente e mais intensamente do que sobre a esteira motorizada, ou até mesmo a roda com motor elétrico. Voluntariamente, os ratos percorrem distâncias duas vezes maiores do que durante o exercício forçado (± 30 km / semana X ± 15 km / semana) (24 , 25 , 27).
- 3 – os ratos que correm voluntariamente em roda de atividade desenvolvem capacidade para atingir facilmente velocidades entre 40 e 60 metros por minuto (12, 25) superiores às alcançadas por ratos em esteira com motor elétrico.

A medida do exercício físico foi realizada através de um contador mecânico, com cinco dígitos, acoplado à roda, que marca o número de circunvoluções executados pelo animal. O número de voltas foi verificado três vezes por semana durante todo o estudo, sempre nos mesmos períodos (12 , 23) e o contador mecânico foi zerado após cada leitura. O cálculo da distância percorrida é feito multiplicando-se o número de voltas pelo perímetro da roda (0,96 metros) e dividindo por 1000 para ser expresso em quilômetros.

A roda de atividade física para ratos está representada na figura 4 – modelo EP 171, foi adquirida da empresa Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto – BR (Figura 4). É confeccionada com estrutura rígida de acrílico cristal com 10 mm de espessura, reforçada para dar maior segurança e estabilidade ao animal. Apresenta-se em desenho que permite ao

Figura 4 – Roda de atividade sem motor elétrico

animal rodar livremente, com acesso livre ao alimento e água, que se encontra em compartimentos anexados à janela da gaiola. A roda de corrida é a própria gaiola. Apresenta um contador mecânico com 5 dígitos e possui as dimensões de 42 cm x 38 cm x 38 cm x 96 cm (altura x largura x comprimento x perímetro).

5.4 – Bomba de Infusão para o Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas (TSGIE)

A bomba de infusão compacta modelo 975, utilizada na realização do Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas, foi adquirida da empresa Harvard Apparatus, Massachusetts – USA. É confeccionada em alumínio anodizado, acionada por motor de passo de alta precisão e com parâmetros programáveis. Possui suporte que se ajusta a seringas de vários tamanhos (5 e 10 ml), as quais podem ser trocadas e adaptadas à velocidade e volume do infusato. Além disso, possui sistema de travamento em polipropileno.

5.5 – Variáveis e Métodos Bioquímicos

5.5.1 – Coleta de sangue

As determinações bioquímicas foram avaliadas em amostras de sangue (500 µl de sangue total) colhidas através da ordenha da cauda do rato mantidos em jejum de 4 horas no momento da randomização (início do estudo) e também antes do início do teste de supressão (final do estudo). As amostras foram centrifugadas e os soros estocados em freezer Ultra Low (– 70°Celsius).

5.5.2 – Glicose

Para a determinação da glicemia, utilizamos o método enzimático-colorimétrico glicose oxidase-peroxidase com reagentes da LABTEST Diagnóstica S.A, Minas Gerais – BR, catálogo 84.

O espectrofotômetro utilizado para leituras finais de absorbância e concentração de ponto final das análises de glicose foi o Ultrospec 3100 pro UV/Visible da Amersham Biosciences.

5.5.3 – Insulina

Para a determinação da insulinemia, utilizamos anticorpos específicos para ratos da LINCO Research, Inc. – USA, com reagentes para radioimunoensaios (RIE), catálogo RI-13K.

As contagens radioativas de ^{125}I foram determinadas em um contador gama automático da PACKARD (Cobra AUTO-GAMMA).

5.5.4 – Ácidos graxos livres

Para a determinação dos ácidos graxos livres, utilizamos o método enzimático-colorimétrico obtida após cálculo da concentração em uma curva padrão, do kit NEFA (Non-Esterified Fatty Acids) adquirido comercialmente da WAKO Chemicals, Inc. – USA, catálogo 994-75409.

As determinações foram adaptadas para leitura em microplacas, utilizando apenas 5 µl de soro. O fotômetro utilizado para essas leituras finais de absorbância e concentração de ponto final das análises de ácidos graxos foi o Multiscan EX da Labsystems, utilizando a leitura dual 540 x 650 nm.

5.5.5 – Hematócrito

O hematócrito foi realizado pelo método de centrifugação (Centrifuge Hematocrit HSIANGTAI Machinery Ind. Co. Ltd) de sangue em micro tubo capilar e o resultado obtido em percentagem do volume sanguíneo ocupado pelos eritrócitos.

Todas as determinações foram estudadas por método manual, em duplicatas, com padrão e amostras controles corridos no mesmo ensaio.

5.6 – Avaliação da sensibilidade à insulina

A avaliação da sensibilidade à insulina foi feita pelo Teste de Supressão de Glicose e Insulina Endógenas com a determinação das áreas sob as curvas da glicose (AUC Glicose) e insulina (AUC Insulina) plasmáticas no final do estudo, em ambos os grupos, Exercício e Sedentário.

5.6.1 – Jejum e anestesia

Os ratos foram retirados da roda de atividade voluntária, 4 horas antes do início do experimento e foram colocados em gaiolas comuns. Em ambos os grupos (Exercício e Sedentário) foram retirados a água e dieta.

A anestesia intraperitoneal (i.p.) foi dada na dose de 0,2 ml/100 gramas de peso animal de pentobarbital de sódio (Thiopentax – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) em uma concentração de 50 mg/kg. A manutenção da dose com 10mg/kg i.p. foi administrada após 90 minutos da primeira dose (12 , 26 , 28).

5.6.2 – Implantação da cânula venosa

Com os animais posicionados em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão cirúrgica na região ventral direita para dissecação e isolamento da veia jugular. Com uma micro incisão transversal na parede do vaso foi introduzido com cânula de polietileno PE 60 (ID.76mm e OD.1,22mm – Intramedic® Polyethylene Tubing, Clay Adams – Divisão Becton Dickinson e Company BD – Parsippany, NJ), preenchidas com solução salina heparinizada (0,9%) em direção ao coração. A cânula foi firmemente amarrada à veia jugular com fio de algodão na região proximal do osso esterno ou escápulas e sua parte mais espessa foi exteriorizada, sendo testada a sua permeabilidade com a introdução de solução heparinizada 0,9%. O cateter da veia jugular foi utilizado para posterior administração do infusato.

Após canulação e término da cirurgia, o animal permaneceu em repouso por 30 minutos antes do início do TSGIE para completar o tempo de 60 minutos para estabilidade metabólica. Em todo o experimento, a temperatura corpórea do animal foi mantida entre 36°C e 37°C por um controlador termostático de calor que consiste

em um sistema de água circulante e chapa aquecedora para sustentação do animal (28).

Antes de iniciar a infusão, foi coletada uma amostra de sangue (500 µl de sangue total) para determinações de glicose, insulina e ácidos graxos livres.

5.6.3 – Preparo do Infusato

Após 30 minutos da canulação, iniciou-se a infusão da solução.

A diluição da glicose foi feita a partir de uma solução 50% e foi preparada para infundir exatamente 20 mg / kg de peso / minuto de glicose.

Foi utilizada análogo da insulina humana, ultra-rápido (Humalog – insulina lispro derivada de ADN recombinante) fabricada por Lilly France S.A.S (Fegersheim – FR), na diluição de 5,0 mU / kg de peso / minuto de insulina.

O infusato teve como solução carreadora, solução fisiológica com albumina bovina (Boehringer Ingelheim Bioproducts – GmbH) na concentração 0,25%, previamente filtrado em filtro Millipore® 0,25µm no sistema estéril de filtragem à vácuo.

5.6.4 – Infusão da glicose e insulina

O teste de supressão (TSGIE) foi iniciado com a infusão constante na taxa de 1,1676 ml/hora do infusato durante um período total de 180 minutos. Considerou-se o ponto de estabilidade, a partir dos 140 minutos da infusão, sendo colhidas as amostras de sangue para dosagens de glicose e insulina, nos tempos 140, 150, 160, 170 e 180 minutos (29 , 30).

A coleta foi realizada após um corte na ponta da cauda, seguida da ordenha e armazenado em microtubo 1,1ml Z-Gel, estéril e descartável, sem anticoagulante comercializado pela empresa SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Germany.

Após a coleta do sangue, o material foi mantido em temperatura entre -2°C e -8°C até o momento da separação do soro pelo método da centrifugação direta. Ao término do teste de supressão, as amostras foram separadas e o soro congelado a -70°C até o momento das análises.

Nas amostras de tempo zero foram determinados os valores das glicoses (GLI), insulinas (INS) e ácidos graxos livres (AGL).

Durante as coletas para realização do teste de supressão, a volemia animal foi mantida com a infusão constante de solução de soro albumina bovina (BSA 0,25g% em solução fisiológica 0,9%) utilizado como veículo de infusão da glicose e insulina. O hematócrito foi determinado no início e ao final do teste, através da centrifugação em sangue capilar fresco, para verificação da presença de hemodiluição decorrente das sucessivas coletas de amostras de sangue (29).

5.7 – Obtenção dos tecidos

Após os experimentos funcionais, os animais foram profundamente anestesiados com redoses (10 mg/kg) de injeção intraperitoneal (i.p.) de pentobarbital de sódio (Thiopentax – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) e, em seguida, foram dissecados.

Para obtenção dos tecidos (músculos esqueléticos sóleus e plantaris e tecido hepático), os ratos continuaram em decúbito dorsal. A abertura do animal na região ventral foi realizada com uma incisão mediana lateral (direita e esquerda), retirando toda a pele do animal na região dos membros inferiores, os músculos esqueléticos

foram delicadamente dissecados desde a região proximal até a porção caudal. Em seguida, nova incisão mediana foi feita na região genital com um pequeno corte do tecido muscular e estendeu-se uma nova incisão mediana ampla por todo o

Figura 5 – Dissecação completa do animal para obtenção dos tecidos.

abdômen de extensão até a caixa torácica e o fígado foi dissecado em seu lóbulo secundário, seguida da eutanásia do animal (figura 5).

Imediatamente após a dissecação de cada tecido, foram lavados em solução salina, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em

freezer Ultra-Low (- 70°C) para posterior análise pela técnica de Western Blot, separados em tubos específicos para armazenagem (3cm x 1cm – capacidade 5 ml).

5.8 – Preparação dos extratos protéicos

Após o congelamento e armazenamento dos músculos, aproximadamente 700mg à 1000mg destes foram homogeneizados em 1,0 ml de tampão de lise para extrato total de proteínas (100mM Tris-base pH 7,5, 1% SDS, 10mM EDTA, 100mM Pirofosfato de Sódio, 100mM Fluoreto de Sódio e 10mM Ortovanato de Sódio) já fervido durante 20 minutos. O material foi homogeneizado em tubo Falcon de 50ml com o equipamento *Polytron PT 2100* (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) e fervido em banho-maria por mais 10 minutos. O material insolúvel foi removido por centrifugação (10.000g por 40 minutos à 4°C) (31).

Uma parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo protéico pelo método de Bradford (Bio-Rad) para determinar a concentração protéica final diante de cada amostra do extrato total de proteínas.

5.9 – Análise por Western Blot

A presente técnica baseia-se na detecção da proteína PGC-1 α a partir de um extrato de tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas. Essas proteínas são, então, transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, onde serão sondadas com anticorpos específicos à proteína PGC-1 α .

No procedimento, uma outra parte do sobrenadante contendo extrato total de proteínas foi ressuspendido em “Tampão Laemmli”, contendo 200mM DTT, na proporção de 5:1 (v:v) (31). Depois de ferver novamente por 5 minutos, 75 ug de proteínas totais foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) em aparelho Mini Protean II para mini-gel, com fonte de energia elétrica (Model Power Pac 3000 – Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules – CA, USA). Em seguida, as proteínas fracionadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose por 1 hora em 100V, utilizando tampão de transferência (24,8mM Tris, 192mM glicina, 10% metanol). Essa transferência das proteínas foi avaliada por coloração com Ponceau-S e, em seguida, as membranas foram lavadas e tratadas com solução bloqueadora constituída de tampão TBS-T (Tris-base 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) contendo leite desnatado Molico® 5%, em 4°C por toda a noite (31).

No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo primário PGC-1 (anticorpo policlonal de coelho promovido contra aminoácidos 1-300

mapeado próximo da porção N-terminal de PGC-1 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz – CA, catálogo SC-13067) em solução bloqueadora diluída 10 vezes por 4 horas em temperatura ambiente (26).

Após incubação as membranas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário apropriado (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase 2 μ l / 20 ml – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz – CA, catálogo SC-51625) por 1 hora em temperatura ambiente. A atividade de peroxidase foi visualizada pelo sistema de detecção quimiluminescente (12 , 26). A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias reveladas em câmara escura. As proteínas foram detectadas por comparação com os pesos moleculares e quantificadas utilizando software Scion Image for Windows (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA) (31).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos pelas Médias $\pm$ Erro Padrão das Médias dos valores individuais e comparados usando *ANOVA one-way* e *teste t de Student não-pareado* com valores de $p \leq 0,05$, nível de significância 5% (34 , 40 , 41).

7. RESULTADOS

7.1 – Avaliação do peso e consumo alimentar dos animais

Os resultados do presente estudo mostram que, ao final de cinco semanas, não houve diferença entre os pesos dos ratos Ex e Sd, entretanto, o peso do alimento consumido foi maior nos ratos Ex. Resultados expressos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais dos pesos (g) de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

	Ex (n = 11)	Sd (n = 13)	p
Início do estudo	188,82 $\pm$ 2,77	190,71 $\pm$ 3,96	0,710
Final do estudo	355,85 $\pm$ 9,51	375,68 $\pm$ 5,30	0,071

Tabela 2 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais do consumo alimentar diário de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

	Ex (n = 11)	Sd (n = 13)	p
Consumo (g /dia)	36,48 $\pm$ 1,03	27,11 $\pm$ 0,58	< 0,001

7.2 – Exercício Físico

Os animais do grupo Ex apresentaram um crescente na evolução do exercício físico até a quarta semana, a partir da qual o percurso manteve-se. Resultados expressos nas Tabela 3 e Figura 6.

Tabela 3 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio da distância percorrida (km / dia) pelos ratos do grupo Exercício.

Grupo Ex	semanas				
	1	2	3	4	5
RE (n = 11)	1,95 $\pm$ 0,40	2,95 $\pm$ 0,42	4,19 $\pm$ 0,45	5,81 $\pm$ 0,75	5,61 $\pm$ 0,67

Figura 6 – Médias $\pm$ EPM das distâncias percorridas diariamente (km / dia), em cada semana, pelos ratos do grupo Exercício.

7.3 – Determinações bioquímicas

7.3.1 – Glicemia de jejum

Os animais dos grupos Ex e Sd não apresentaram diferenças nos valores de glicemias (mg / dl) de jejum, após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária (Tabela 4).

7.3.2 – Insulinemia de jejum

Após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária, os ratos do grupo Ex apresentaram concentrações plasmáticas de insulina (ng / ml) menores do que os ratos do grupo Sd ($p < 0,001$) (Tabela 4).

7.3.3 – Ácidos graxos livres de jejum

Os ratos do grupo Ex apresentaram menores concentrações de ácidos graxos livres de jejum (mEq / L) em relação aos controles (Sd), após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária (Tabela 4).

Tabela 4 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais de glicose (mg/dl), insulina (ng/ml) e ácidos graxos livres (mEq/l) de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

	Ex (n = 11)	Sd (n = 13)	p
GLI	117,60 $\pm$ 3,69	122,40 $\pm$ 2,62	0,295
INS	0,70 $\pm$ 0,12	1,45 $\pm$ 0,14	< 0,001
AGL	1,12 $\pm$ 0,11	1,61 $\pm$ 0,11	0,006

7.4 – Teste de Supressão da Glicose e Insulina Endógenas

Os resultados foram obtidos considerando-se a área sob as curvas de glicose e insulina, cujos resultados são expressos na Tabela 5 e Figura 7. As áreas de glicose e insulina foram semelhantes entre os grupos Ex e Sd.

Tabela 5 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais das Áreas sob a Curva de Glicemia (mg / dl / min) e Insulina (ng / ml / min), durante o Teste de Supressão de Glicose e Insulina Endógenas de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

	Ex (n = 11)	Sd (n = 13)	p
AUC Glicose	2,77 $\pm$ 0,12	2,95 $\pm$ 0,07	0,205
AUC Insulina	0,81 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,09	0,310

Figura 7 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais das Áreas sob as Curvas de Glicose e Insulina.

7.5 – Western Blot

7.5.1 – Fígado

Os animais dos grupos Ex e Sd apresentaram concentrações de PGC-1 α em fígado semelhantes, quando medidas pelo WB e expressas em Unidades Arbitrárias (UA), após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária (Tabela 6 e Figura 8).

7.5.2 – Músculo esquelético soleus

Após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária, não houve diferença no conteúdo de PGC-1 α em músculo esquelético soleus, entre os grupos Ex e Sd. Unidades expressas em valores arbitrários (Tabela 6 e Figura 8).

7.5.3 – Músculo esquelético plantaris

Após 5 semanas de exercício físico em roda de atividade voluntária o conteúdo de PGC-1 α medida pelo WB em músculo esquelético plantaris foi maior no grupo Ex do que em grupo Sd ($p < 0,001$) (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6 – Média $\pm$ Erro Padrão Médio dos valores individuais do conteúdo de proteína PGC-1 α (UA) analisado pelo Western Blot, em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris, de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

	Ex (n = 9)	Sd (n = 9)	<i>p</i>
Fígado	2,08 $\pm$ 0,23	2,44 $\pm$ 0,06	0,153
Sóleos	1,50 $\pm$ 0,17	1,38 $\pm$ 0,19	0,638
Plantaris	1,74 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,12	< 0,001

Figura 8 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais (UA) do conteúdo de proteína PGC-1 α analisado pelo Western Blot, em fígado e músculos esqueléticos soleus e plantaris, de ratos machos Wistar dos grupos Exercício e Sedentário.

Figura 9 – Médias $\pm$ EPM dos valores individuais do conteúdo de proteína PGC-1 α (UA) analisado pelo Western Blot em diferentes tecidos.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do exercício, durante cinco semanas em roda de atividade voluntária, sobre a expressão do coativador PGC-1 α , em fígado e músculos esqueléticos, soleus (SOL) e plantaris (PLA) de ratos machos Wistar, avaliando em paralelo a sensibilidade à insulina. Os resultados mostraram que a concentração da proteína PGC-1 α foi maior no músculo PLA dos ratos Ex do que os ratos Sd, e que o músculo SOL não apresentou diferença na concentração da PGC-1 α entre os ratos Ex e Sd. Ao final da quinta semana, quando os animais foram submetidos ao teste de infusão e à cirurgia, não havia diferença entre os pesos nos dois grupos, portanto, a PGC-1 α aumentou no músculo PLA em resposta ao exercício, não tendo a variação de peso como um fator que pudesse interferir.

Escolhemos como modelo de exercício, a roda de atividade voluntária por ser eficaz como modelo de exercício para esses animais, entretanto, sabe-se que há grande variação no comportamento dos animais em relação ao exercício físico. Conforme a literatura (32), a distância mínima diária a ser percorrida pelo rato para o exercício ser eficaz é de 2,5 km/dia e, os animais em estudo percorreram $5,81 \pm 2,49$ e $5,61 \pm 2,23$ km/dia, durante as semanas 4 e 5, respectivamente, quando atingiram o máximo de sua capacidade de exercício.

As respostas aos estímulos fisiológicos estão relacionadas aos tipos de fibras musculares. Em camundongos expostos ao frio, houve aumento expressivo do mRNA do GLUT4 no músculo esquelético gastrocnemius, mas não no músculo esquelético soleus (33). A exposição ao frio e o exercício intenso são estímulos que requerem ajustes no metabolismo mitocondrial, como ocorreu no músculo PLA (predomínio de fibras de contração rápida e curta). O músculo SOL (predomínio de fibras altamente oxidativas, contração lenta e longa) não apresentou resposta e,

provavelmente, não foi envolvido no exercício. Pelas suas características morfológicas, o músculo SOL será envolvido em exercícios de grande intensidade. Estes dados estão de acordo com Ikeda e colaboradores (34) que encontraram aumento da PGC-1 α em PLA e TA (músculo esquelético tibial anterior) de camundongos fêmeas ICR, mas não em SOL, após 8 semanas de exercício.

Com variações em metodologias referentes ao tipo de exercício ou espécie animal, os resultados do presente estudo estão de acordo com os resultados de outros autores: a expressão do mRNA da PGC-1 α (Northern Blot) aumentou após carga de exercício (natação) em músculo esquelético de ratos machos Wistar (26); aumentou em músculo esquelético de fêmeas de camundongos ICR após exercício em roda de atividade voluntária (34) e; aumentou em músculo tríceps de humanos, predominante em fibras tipo IIA, após exercício agudo (39). Nas primeiras fases do exercício a energia necessária vem da quebra de glicogênio intracelular, com maior participação dos músculos ricos em fibras do tipo IIA – oxidativas-glicolíticas, não atingindo o mecanismo de oxidação fosforilativa, característico das fibras do tipo I (SOL).

Demonstramos também que a concentração de PGC-1 α em fígado não foi diferente entre os ratos Ex e Sd. Na literatura não encontramos referências sobre efeitos do exercício especificamente sobre a PGC-1 α em fígado, mas existem vários estudos que se referem ao aumento das enzimas hepáticas da oxidação fosforilativa após o exercício. Laye e colaboradores (35) demonstraram que o exercício aumentou as enzimas mitocondriais em fígado de ratos; Quiles e colaboradores demonstraram que aumentou em 50% a concentração da citocromo-C oxidase em fígado de ratos (36), não havendo dúvidas sobre o efeito do exercício no aumento da OXPHOS no hepatócito.

A expressão da PGC-1 α é regulada pela via cAMP e pela ativação do fator transcricional CREB. Os efeitos biológicos da PGC-1 α em fígado podem ser mais bem demonstrados em situações com elevação do nível de cAMP intra-celular, como é o caso do jejum (20). Foi demonstrado que a PGC-1 α é um dos alvos mais importantes na via de sinalização do cAMP em camundongos durante o jejum e em modelos animais com DM1 ou DM2, fato este que lhe confere um importante papel na gliconeogênese hepática e nas enzimas deste processo (37).

O exercício e a regulação da PGC-1 α são sinalizados pela via cAMP. A ausência de resposta da PGC-1 α ao exercício no fígado sugere algumas explicações: 1 – o exercício não foi suficientemente intenso para estimular a PGC-1 α no fígado; 2 – a proteína PGC-1 α não é o único fator a controlar o efeito do exercício sobre a oxidação fosforilativa hepática em ratos machos Wistar.

No presente estudo, embora não tenha sido medida a taxa de oxidação mitocondrial hepática, foram realizadas medidas dos ácidos graxos livres, glicose e insulina de jejum. As concentrações plasmáticas de AGL no jejum, foram menores no grupo Ex, sugerindo aumento da oxidação de gorduras neste grupo. No jejum, as glicemias foram semelhantes em ambos os grupos, entretanto, as concentrações plasmáticas de insulina foram menores no grupo Ex e, estes dados sugerem que os ratos exercitados apresentaram maior sensibilidade à insulina no jejum.

A sensibilidade à insulina avaliada no período de estabilização da glicose, durante o TSGIE, foi semelhante entre grupos Ex e Sd. Estes dados sugerem que o exercício não foi suficiente para aumentar a sensibilidade à insulina durante um teste de supressão, mas foi suficiente para aumentar a sensibilidade à insulina no estado de jejum. Acreditamos que tal fato pode ser explicado por ser o jejum um estado mais fisiológico do que o teste de supressão. Em estudos anteriores com ratos

Sprague Dawley em roda de atividade, o teste de supressão foi realizado na 8ª (23) ou na 16ª semana (29) de exercício e em ambos, houve aumento da sensibilidade à insulina. Ikeda e colaboradores descreveram o aumento da sensibilidade à insulina através da expressão de proteínas mitocondriais e GLUT-4, a partir da 3ª semana em camundongos que permaneceram em roda de atividade voluntária (34). Em relação à linhagem dos ratos, Suwa e colaboradores atribuíram à qualidade do músculo esquelético o talento para a corrida, sendo que ratos cujos músculos são mais ricos em fibras oxidativas, apresentam maior facilidade e predisposição genética para a corrida mecânica ou demanda fisiológica (38).

Os objetivos deste estudo visaram esclarecer alguns aspectos do metabolismo da glicose e ácidos graxos livres relacionados à expressão da PGC-1 α em tecidos alvos da ação insulínica. O exercício físico é um dos mais importantes estímulos para o músculo esquelético, insulina e a fosforilação oxidativa, que é regulada pela PGC-1 α . Além disso, o papel do exercício na expressão da PGC-1 α em fígado, ainda não havia sido descrito, embora existam alguns relatos sobre a ativação das enzimas fosforilativas.

Em resumo, o exercício aumentou a expressão da PGC-1 α em músculo PLA e a sensibilidade à insulina, evidenciada pela menor concentração da insulina de jejum. O exercício reduziu as concentrações de ácidos graxos livres no jejum, sugerindo que houve estímulo no processo de oxidação de ácidos graxos livres. A ausência de resposta da PGC-1 α ao exercício em SOL e fígado, pode estar relacionada ao não envolvimento desses tecidos no exercício ou a não participação da PGC-1 α na melhora da sensibilidade à insulina desses tecidos, no modelo estudado.

9. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que, o exercício em roda de atividade voluntária durante cinco semanas, promoveu em ratos machos Wistar, aumento da sensibilidade à insulina e oxidação de ácidos graxos livres, associado ao aumento da expressão da PGC-1 α em músculo esquelético plantaris. Entretanto, em outros tecidos alvos da ação insulínica, como fígado e músculo esquelético soleus, não houve maior expressão da PGC-1 α . Estes dados sugerem que, fígado e músculo esquelético soleus podem não ter sido envolvidos no exercício ou que, a expressão da PGC-1 α nesses tecidos não esteve associada a melhora da sensibilidade à insulina no presente modelo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PUIGSERVER P.; SPIEGELMAN B.M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. **Endocrine Reviews** 24(1):78-90, 2003.
2. PUIGSERVER P.; WU Z.; PARK C.W.; GRAVES R.; WRIGHT M.; SPIEGELMAN B.M. A cold inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell** 92:829-839, 1998.
3. FINCK B.N.; KELLY D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. **J. Clin. Invest.** 116:615-622, 2006.
4. CANNON B.; HOUSTEK J.; NEDERGAARD J. Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis. **Annals New York Academy of Sciences** 856:171-187, 1998.
5. REITMAN M.L.; HE Y.; GONG D.W. Thyroid hormone and other regulators of uncoupling proteins. **Inst Obes Relat Metab Disord** 23(S6):S56-S59, 1999.
6. SILVA J.E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid** 5:481-492, 1995.
7. WU Z.; PUIGSERVER P.; ANDERSSON U.; ZHANG C.; ADELMANT G.; MOOTHA V.; TROY A.; CINTI S.; LOWELL B.; SCARPULLA R.C.; SPIEGELMAN B.M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell** 98:115-119, 1999.
8. RANDLE P.J.; PRIESTMAN D.A.; MISTRY S.C.; HALSALL A. Glucose fatty acids interactions and the regulation of glucose disposal. **J. Cell Biochem.** 55(Suppl):1-11, 1994.
9. WU Z.; PUIGSERVER P.; ANDERSSON U.; ZHANG C.; ADELMANT G.; MOOTHA V.; TROY A.; CINTI S.; LOWELL B.; SCARPULLA R.C.; SPIEGELMAN B.M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell** 98:115-24, 1999.
10. MICHAEL L.F.; WU Z.; CHEATHAM R.B.; PUIGSERVER P.; ADELMANT G.; LEHMAN J.J.; KELLY D.P.; SPIEGELMAN B.M. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:3820-3825, 2001.
11. MORTENSEN O.H.; PLOMGAARD P.; FISCHER C.P.; HANSE A.K.; PILEGAARD H.; PEDERSEN B.K. PGC-1 β is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day. **J. Appl. Physiol.** 103:1536-1542, 2007.

12. AKIMOTO T.; POHNERT S.C.; LI P.; ZHANG M.; GUMBS C.; ROSENBERG P.B.; WILLIAMS R.S.; YAN Z. Exercise stimulates PGC-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. **J. Biol. Chem.** 280(20):19587-19593, 2005.
13. HANDSCHIN C.; RHEE J.; LIN J.; TARR P.T.; SPIEGELMAN B.M. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α expression in muscle. **PNAS** 100:7111-7116, 2003.
14. LIN J.; WU H.; TARR P.T.; ZHANG C.Y.; WU Z.; BOSS O.; MICHAEL L.F.; PUIGSERVER P.; ISOTANI E.; OLSON E.N.; LOWELL B.B.; BASSEL-DUBY R.; SPIEGELMAN B.M. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature** 418:797-801, 2002.
15. LIN J.; HANDSCHIN C.; SPIEGELMAN B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.** 1:361-370, 2005.
16. LEONE T.C.; LEHMAN J.J.; FINCK B.N.; SCHAEFFER P.J.; WENDE A.R.; BOUDINA S.; COURTOIS M.; WOZNIAK D.F.; SAMBANDAM N.; BERNAL-MIZRACHI C.; CHEN Z.; HOLLOSZY J.O.; MEDEIROS D.M.; SCHMIDT R.E.; SAFFITZ J.E.; ABEL E.D.; SEMENKOVICH C.F.; KELLY D.P. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. **PLoS Biology** 3(4):e101, 2005.
17. KELLEY D.E.; HE J.; MENSHIKOVA E.V.; RITOV V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes** 51:2944-2950, 2002.
18. YOON J.C.; PUIGSERVER P.; CHEN G.; DONOVAN J.; WU Z.; RHEE J.; ADELMANT G.; STAFFORD J.; KAHN R.C.; GRANNER D.K.; NEWGARD C.B.; SPIEGELMAN B.M. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature** 413:131-138, 2001.
19. HERZIG S.; LONG F.; JHALA U.S.; HEDRICK S.; QUINN R.; BAUER A.; RUDOLPH D.; SCHUTZ G.; YOON C.; PUIGSERVER P.; SPIEGELMAN B.; MONTMINY M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature** 413:179-183, 2001.
20. PUIGSERVER P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC-1 α . **International Journal of Obesity** 29:55-59, 2005.
21. OBERKOFER H.; KLEIN K.; FELDER T.K.; KREMPLER F.; PATSCH W. Role of PGC-1 α in the transcriptional regulation of the human UCP2 gene in INS-1E cells. **Endocrinology** 147(2):966-76, 2005.

22. MORINO K.; PETERSEN K.F.; DUFOUR S.; BEFROY D.; FRATTINI J.; SHATZKES N.; NESCHEN S.; WHITE M.F.; BILZ S.; SONO S.; PYPAERT M.; SHULMAN G.I. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. **The Journal of Clinical Investigation** 115:3587-3593, 2005.
23. SANTOS R.F.; MONDON C.E.; REAVEN G.M.; AZHAR S. Effects of exercise training on the relationship between insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity in rat skeletal muscle. **Metabolism** 38:376-386, 1989.
24. SEXTON W.L. Vascular adaptations in rat hindlimb skeletal muscle after voluntary running-wheel exercise. **J. Appl. Physiol.** 79:287-295, 1995.
25. RODNICK K.J.; REAVEN G.M.; HASKEU W.L.; SIMS C.R.; MONDON C.E. Variations in running activity and enzymatic adaptations in voluntary running rats. **J. Appl. Physiol.** 66:1250-1257, 1989.
26. BAAR K.; WENDE A.R.; JONES T.E.; MARISON M.; NOLTE L.A.; CHEN M.; KELLY D.P.; HOLLOSZY J.O. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. **FASEB J.** 16:1879-1886, 2002.
27. MIDAOUY A.E.; TANCRÈDE G.; NADEAU A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism** 45(7):810-816, 1996.
28. SAHA J.K.; XIA J.; GRONDIN J.M.; ENGLE S.K.; JAKUBOWSKI J.A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Exp. Biol. Med. (Maywood)** 230(10):777-784, 2005.
29. SANTOS R.F.; AZHAR S.; MONDON C.; REAVEN G.M. Prevention of insulin resistance by environmental manipulation as young rats mature. **Hormone and Metabolic Research** 21:55-58, 1989.
30. DALL'AGLIO E.; TOSINI P.; ZAVARONI I.; OLIVETTI G.; REAVEN G.M.; Comparison of the metabolic changes in rats with hypertension secondary to fructose feeding or renal artery stenosis. **American Journal of Hypertension** 8:524-527, 1995.
31. HABER E.P.; HIRABARA S.M.; GOMES A.D.; CURI R.; CARPINELLI A.R.; CARVALHO C.R.O. Palmitate modulates the early steps of insulin signalling pathway in pancreatic islets. **FEBS Letters** 544:185-188, 2003.
32. PHILIPPE H.L. Physiologie de l'exercice. Bibliothèque Nationale Du Canada Wellington Street 395. Rue Wellington Ottawa, ON K1A0N4 Canada.

33. WANG Z.; KONTANI Y.; SATO Y.; MIZUNO T.; MORI N.; YAMASHITA H. Muscle type difference in the regulation of UCP3 under cold conditions. **Biochem Biophys Res Commun** 305(2):244-9, 2003.
34. IKEDA S.; KAWAMOTO H.; KASAOKA K.; HITOMI Y.; KIZAKI T.; SANKAI Y.; OHNO H.; HAGA S.; TAKEMASA T. Muscle type-specific response of PGC-1 α and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle. **Acta Physiol.** 188:217-223, 2006.
35. LAYE M.J.; RECTOR R.S.; BORENGASSER S.J.; NAPLES S.P.; UPTERGROVE G.M.; IBDAH J.A.; BOOTH F.W. and THYFAULT J.P. Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue. **J Appl Physiol** 106:161-168, 2009.
36. QUILES J.L.; HUERTAS J.R.; MAÑAS M.; OCHOA J.J.; BATTINO M. and MATAIX J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** 33:127-134, 2001.
37. PARKER J.C.; JARETT L. Insulin mediator stimulates pyruvate dehydrogenase of intact liver mitochondria. **Diabetes** 34(1):92-97, 1985.
38. SUWA M.; NAKANO H.; HIGAKI Y.; NAKAMURA T.; KATSUTA S.; KUMAGAI S. Increased wheel-running activity in the genetically skeletal muscle fast-twitch fiber-dominant rats. **J. Appl. Physiol.** 94:185-192, 2003.
39. PILEGAARD H.; SALTIN B. & NEUFER P.D. Exercises induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **J Physiol** 546:851-858 (2003).
40. KIRKWOOD B.R. Essentials Medical Statistics. **2nd Ed. London: Blackwill Science Ltd.** 501p., 2003.
41. SOARES, J.F.; SIQUEIRA A.L. Introdução à estatística médica. **2nd Ed. Belo Horizonte: COOPMED.** 300p., 2002.

APÊNDICE

Tabela 1 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio do consumo diário de dieta (g) e variação do peso diário e total (g) de ratos do grupo Ex (n = 11).

número do rato	TEMPO DE ESTUDO (dias)	PESO (g) BASAL 1	PESO (g) BASAL 2	DELTA (g)	GANHO DIÁRIO PESO (g)	CONSUMO DIÁRIO (g / dia)
RE3	36,00	208,50	360,80	152,30	4,23	38,15
RE4	32,00	197,20	390,80	193,60	6,05	32,45
RE5	36,00	188,60	365,70	177,10	4,92	38,25
RE6	38,00	177,40	294,80	117,40	3,09	40,39
RE7	37,00	185,50	360,70	175,20	4,74	37,18
RE8	37,00	192,10	321,80	129,70	3,51	37,81
RE9	35,00	195,80	384,40	188,60	5,39	33,70
RE10	37,00	186,40	324,50	138,10	3,73	29,22
RE11	35,00	186,40	394,30	207,90	5,94	38,41
RE14	40,00	180,90	372,60	191,70	4,79	35,78
RE15	40,00	178,20	343,90	165,70	4,14	39,96
Média	36,64	188,82	355,85	167,03	4,59	36,48
DP	2,29	9,20	31,55	29,21	0,96	3,41
EPM	0,69	2,77	9,51	8,81	0,29	1,03

BASAL 1 = data da randomização (início do estudo)

BASAL 2 = após 5 semanas de exercício físico (final do estudo)

Tabela 2 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio do consumo diário de dieta (g) e variação do peso diário e total (g) de ratos do grupo Sd (n = 13).

número do rato	TEMPO DE ESTUDO (dias)	PESO (g) BASAL 1	PESO (g) BASAL 2	DELTA (g)	GANHO DIÁRIO PESO (g)	CONSUMO DIÁRIO (g / dia)
RS3	38,00	207,10	334,80	127,70	3,36	24,38
RS5	43,00	180,50	366,70	186,20	4,33	25,40
RS6	41,00	178,30	374,20	195,90	4,78	26,22
RS7	39,00	175,40	352,20	176,80	4,53	24,75
RS8	44,00	192,80	380,10	187,30	4,26	27,39
RS9	32,00	197,90	396,40	198,50	6,20	29,11
RS11	37,00	178,60	396,20	217,60	5,88	29,07
RS14	42,00	206,80	390,40	183,60	4,37	26,41
RS15	38,00	178,60	376,30	197,70	5,20	26,68
RS17	30,00	214,50	374,20	159,70	5,32	28,40
RS18	38,00	179,30	382,50	203,20	5,35	26,12
RS19	38,00	181,60	358,60	177,00	4,66	26,48
RS20	34,00	207,80	401,20	193,40	5,69	32,07
Média	38,00	190,71	375,68	184,97	4,92	27,11
DP	4,12	14,26	19,11	22,34	0,78	2,10
EPM	1,14	3,96	5,30	6,20	0,22	0,58

BASAL 1 = data da randomização (início do estudo)
BASAL 2 = após 5 semanas de exercício físico (final do estudo)

Tabela 3 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio da distância percorrida diariamente (km / dia) em cada semana pelos ratos do grupo Ex (n = 11).

GRUPO (Ex) (n = 11)	SEMANAS				
	1	2	3	4	5
RE3	2,27	2,74	3,26	5,99	5,87
RE4	1,71	3,01	3,87	6,18	4,21
RE5	4,53	2,57	3,12	3,66	3,67
RE6	0,95	4,37	6,65	10,15	9,92
RE7	1,76	4,11	4,93	4,61	4,19
RE8	2,66	5,36	6,70	7,52	7,61
RE9	0,24	1,58	2,40	2,57	3,79
RE10	2,35	3,96	4,41	6,86	6,77
RE11	3,60	2,27	2,84	3,39	3,60
RE14	0,42	0,67	2,82	3,69	3,75
RE15	0,95	1,79	5,08	9,30	8,33
Média	1,95	2,95	4,19	5,81	5,61
DP	1,32	1,39	1,51	2,49	2,23
EPM	0,40	0,42	0,45	0,75	0,67

Tabela 4 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl), insulina (ng/ml) e ácidos graxos livres (mEq/L) de ratos do grupo Ex (n = 11).

GRUPO (Ex) (n = 11)	Glicemia		Insulinemia		Ácidos Graxos Livres	
	BASAL 1	BASAL 2	BASAL 1	BASAL 2	BASAL 1	BASAL 2
RE3	130,00	107,00	1,60	0,56	0,62	1,69
RE4	134,00	121,00	1,30	1,16	0,67	0,84
RE5	134,00	118,00	1,06	1,12	0,74	1,36
RE6	132,00	136,00	0,58	0,88	1,18	1,00
RE7	138,00	95,00	1,68	0,76	1,33	1,06
RE8	126,00	104,00	0,36	0,16	0,66	0,64
RE9	124,00	126,00	3,28	0,92	1,14	1,21
RE10	123,00	123,00	1,22	0,80	0,73	1,02
RE11	138,00	126,00	0,62	0,22	0,38	1,79
RE14	88,00	128,00	0,52	1,00	0,81	0,72
RE15	112,00	110,00	0,48	0,08	0,58	0,98
Média	125,36	117,64	1,15	0,70	0,80	1,12
DP	14,55	12,23	0,84	0,39	0,29	0,37
EPM	4,39	3,69	0,25	0,12	0,09	0,11

BASAL 1 = data da randomização (início do estudo)

BASAL 2 = após 5 semanas de exercício físico (final do estudo)

Tabela 5 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl), insulina (ng/ml) e ácidos graxos livres (mEq/L) de ratos do grupo Sd (n = 13).

GRUPO (Sd) (n = 13)	Glicemia		Insulinemia		Ácidos Graxos Livres	
	BASAL 1	BASAL 2	BASAL 1	BASAL 2	BASAL 1	BASAL 2
RS3	121,00	126,00	1,04	1,60	1,41	1,32
RS5	121,00	109,00	2,40	2,24	0,77	1,29
RS6	151,00	122,00	4,86	1,48	0,73	1,49
RS7	137,00	133,00	1,34	1,24	0,68	1,52
RS8	105,00	122,00	1,54	1,72	1,17	1,42
RS9	93,00	118,00	0,96	1,36	1,67	1,22
RS11	120,00	126,00	0,34	1,20	0,94	1,46
RS14	125,00	122,00	0,28	2,32	0,88	1,98
RS15	111,00	121,00	0,78	0,84	0,80	2,19
RS17	113,00	117,00	2,52	1,60	1,03	2,35
RS18	86,00	126,00	0,16	1,72	0,72	1,24
RS19	147,00	143,00	0,22	0,96	1,10	1,23
RS20	138,00	106,00	1,22	0,56	0,58	2,15
Média	120,62	122,38	1,36	1,45	0,96	1,60
DP	19,50	9,47	1,30	0,51	0,31	0,41
EPM	5,41	2,63	0,36	0,14	0,09	0,11

BASAL 1 = data da randomização (início do estudo)

BASAL 2 = após 5 semanas de exercício físico (final do estudo)

Tabela 6 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl), durante o teste de supressão da glicose e insulina endógenas de ratos do grupo Ex (n = 11).

GRUPO (Ex) (n = 11)	Tempo 0	140min	150min	160min	170min	180min	SSPG
	glicose	glicose	glicose	glicose	glicose	glicose	
RE3	107,0	234,0	249,0	252,0	255,0	220,0	245,8
RE4	121,0	145,0	144,0	149,0	156,0	137,0	147,5
RE5	118,0	156,0	143,0	141,0	143,0	116,0	140,8
RE6	136,0	162,0	167,0	169,0	167,0	142,0	163,8
RE7	95,0	159,0	164,0	202,0	254,0	277,0	209,5
RE8	104,0	224,0	220,0	209,0	211,0	222,0	215,8
RE9	126,0	195,0	200,0	188,0	182,0	193,0	191,0
RE10	123,0	226,0	228,0	230,0	235,0	241,0	231,6
RE11	126,0	146,0	142,0	136,0	129,0	124,0	135,5
RE14	128,0	155,0	161,0	168,0	163,0	164,0	162,9
RE15	110,0	138,0	132,0	119,0	113,0	110,0	122,0
Média	117,6	176,4	177,3	178,5	182,5	176,9	178,7
DP	12,2	36,3	40,2	41,8	49,5	56,8	42,1
EPM	3,7	10,9	12,1	12,6	14,9	17,1	12,7

SSPG = “Steady State Plasma Glucose”

Tabela 7 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de glicose (mg/dl), durante o teste de supressão da glicose e insulina endógenas de ratos do grupo Sd (n = 13).

GRUPO (Sd) (n = 13)	Tempo 0	140min	150min	160min	170min	180min	SSPG
	glicose	glicose	glicose	glicose	glicose	glicose	
RS3	126,0	192,0	196,0	202,0	205,0	223,0	202,6
RS5	109,0	224,0	213,0	220,0	237,0	225,0	223,6
RS6	122,0	187,0	192,0	193,0	196,0	201,0	193,8
RS7	133,0	214,0	196,0	201,0	205,0	206,0	203,0
RS8	122,0	171,0	182,0	192,0	200,0	217,0	192,0
RS9	118,0	154,0	162,0	159,0	159,0	163,0	159,6
RS11	126,0	213,0	216,0	232,0	235,0	243,0	227,8
RS14	122,0	157,0	158,0	164,0	180,0	185,0	168,3
RS15	121,0	221,0	228,0	231,0	229,0	229,0	228,3
RS17	117,0	193,0	182,0	184,0	176,0	179,0	182,0
RS18	126,0	161,0	156,0	158,0	162,0	168,0	160,1
RS19	143,0	195,0	189,0	178,0	166,0	165,0	178,3
RS20	106,0	182,0	173,0	171,0	167,0	172,0	172,0
Média	122,4	189,5	187,9	191,2	193,6	198,2	191,6
DP	9,5	24,0	22,5	25,5	27,9	27,7	24,4
EPM	2,6	6,7	6,2	7,1	7,7	7,7	6,8

SSPG = “Steady State Plasma Glucose”

Tabela 8 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de insulina (ng/ml), durante o teste de supressão da glicose e insulina endógenas de ratos do grupo Ex (n = 11).

GRUPO (Ex) (n = 11)	Tempo 0	140min	150min	160min	170min	180min	SSPI
	insulina	insulina	insulina	insulina	insulina	insulina	
RE3	0,56	12,4	12,8	17,6	13,6	10,4	13,9
RE4	1,16	5,6	5,1	4,5	5,5	4,8	5,1
RE5	1,12	7,3	7,1	7,0	5,6	4,1	6,4
RE6	0,88	7,5	7,7	7,9	7,7	6,9	7,6
RE7	0,76	8,8	7,6	14,0	11,7	9,4	10,6
RE8	0,16	4,6	3,4	7,1	8,2	8,5	6,3
RE9	0,92	11,5	11,8	11,5	11,6	7,4	11,1
RE10	0,80	12,0	14,4	14,6	15,3	12,8	14,2
RE11	0,22	1,8	1,7	2,7	3,1	2,8	2,5
RE14	1,00	2,5	1,2	0,4	0,4	0,4	0,9
RE15	0,08	0,4	0,4	0,7	0,6	0,5	0,5
Média	0,19	3,1	2,5	3,3	3,7	2,8	3,1
DP	0,65	6,5	6,3	7,6	7,3	5,9	6,8
EPM	0,40	4,1	4,8	5,7	5,0	4,0	4,7

SSPI = “Steady State Plasma Insulin”

Tabela 9 - Valores individuais Basais, Médias, Desvio Padrão e Erro Padrão Médio das concentrações plasmáticas de insulina (ng/ml), durante o teste de supressão da glicose e insulina endógenas de ratos do grupo Sd (n = 13).

GRUPO (Sd) (n = 13)	Tempo 0	140min	150min	160min	170min	180min	SSPI
	insulina	insulina	insulina	insulina	insulina	insulina	
RS3	1,60	8,0	9,8	8,4	9,2	8,9	9,0
RS5	2,24	11,3	12,6	10,8	10,6	12,1	11,4
RS6	1,48	7,2	7,9	7,3	6,1	5,2	6,9
RS7	1,24	9,0	10,9	14,9	10,4	10,1	11,4
RS8	1,72	3,8	6,9	2,7	2,6	3,9	4,0
RS9	1,36	7,2	4,2	4,3	5,2	5,8	5,1
RS11	1,20	5,0	5,6	6,1	8,6	9,3	6,9
RS14	2,32	9,3	10,6	16,9	15,7	15,7	13,9
RS15	0,84	15,5	10,7	11,5	10,8	10,9	11,6
RS17	1,60	7,0	6,8	3,1	5,6	1,1	4,9
RS18	1,72	8,8	8,8	8,0	9,4	10,5	9,0
RS19	0,96	8,8	8,8	9,0	8,4	1,3	7,8
RS20	0,56	3,8	2,4	3,8	3,2	1,2	3,0
Média	1,45	8,1	8,2	8,2	8,1	7,4	8,1
DP	0,51	3,1	2,9	4,4	3,6	4,7	3,4
EPM	0,14	0,9	0,8	1,2	1,0	1,3	0,9

SSPI = "Steady State Plasma Insulin"

Figura 1 – Gráfico da distância percorrida (km/dia) por cada rato macho Wistar do grupo Ex, durante a 5ª. semana.

Figura 2 – Gráfico para avaliação da sensibilidade à insulina com os valores médios do SSPG (mg/dl) e SSPI (ng/ml) obtidos no teste de supressão da glicose e insulina endógenas. Resultados expressos em Médias $\pm$ EPM dos valores individuais.