

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

GABRIELLE DA LUZ

**O EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA RESISTÊNCIA À INSULINA,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE DE RETÍCULO NO TECIDO ADIPOSEO E
HEPÁTICO DE RATOS OBESOS**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

GABRIELLE DA LUZ

**O EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA RESISTÊNCIA À INSULINA,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE DE RETÍCULO NO TECIDO ADIPOSEO E
HEPÁTICO DE RATOS OBESOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L979e Luz, Gabrielle da.

O exercício físico melhora resistência à insulina, inflamação e estresse de retículo no tecido adiposo e hepático de ratos obesos / Gabrielle da Luz; orientador: Cláudio Teodoro de Souza. – Criciúma : Ed. do Autor, 2011.

63 f. : il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma (SC), 2011.

1. Obesidade. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Estresse de Retículo. 4. Resistência à insulina. 5. Exercício físico. I. Título.

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 364/14^a -
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

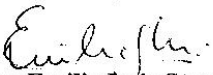
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

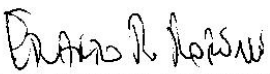
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata **Gabrielle da Luz** sob o título **“O exercício físico melhora resistência à insulina e estresse de retículo no tecido adiposo e hepático de ratos obesos”** para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação, com conceito A.

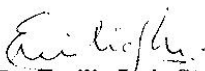
Criciúma, SC, 30 de junho de 2011


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Membro Relator


Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira
Membro Interno


Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle
Membro - UNICAMP


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Orientador


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

***Dedico a minha família, com quem divido o
mérito desta conquista.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por suas importantes manifestações em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Cláudio Teodoro de Souza, pelo entusiasmo com que ensina a pesquisa e por sua orientação competente.

Aos amigos do laboratório: Viviane, Marcelo, Patrícia, Schérolin, Thais, Daiane, Daniela e Pricila que me acompanharam nesta jornada, sempre dispostos a colaborar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Sinto-me orgulhosa por ter mestre com tamanha competência e dedicação pela pesquisa.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, que com sua excelência, proporcionou a construção de mais uma etapa de minha formação.

Aos meus pais, irmãs, cunhados e sobrinhos por me ensinarem o que é mais importante na vida.

Ao Thiago, querido companheiro de todas as horas.

***“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário.”***

Albert Einstein

RESUMO

A obesidade acomete milhões de pessoas em todo planeta, principalmente nos países ocidentais, sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública mundial. Além dos inúmeros aspectos comportamentais e sociais, a obesidade vem sendo implicada no aumento da morbidade e mortalidade em decorrência da associação com diversas doenças crônicas não-transmissíveis, como o diabetes mellitus tipo 2. Durante o quadro de obesidade observa-se a exacerbação de citocinas inflamatórias e do estresse de retículo no tecido hepático e adiposo, que estão relacionados a indução de inúmeras disfunções metabólicas, como a resistência à insulina. O objetivo desse estudo foi investigar os mecanismos de ação do exercício físico sobre o quadro de inflamação, estresse de retículo e resistência à insulina em ratos obesos por dieta hiperlipídica. Para isso, os ratos foram alimentados com ração padrão para roedores (3948 kcal.kg⁻¹) ou dieta rica em gordura (5358 kcal.kg⁻¹) por 2 meses. Depois, os ratos foram submetidos ao treinamento de natação (1 hora por dia, cinco dias por semana, com sobrecarga de 5% do peso corporal durante 8 semanas). As amostras de tecido adiposo epididimal e do fígado foram obtidas e análises moleculares por imunoblot foram realizadas. Estes resultados mostraram que o protocolo de exercício físico reduz moléculas pró-inflamatórias (pJNK, I κ B e NF- κ B) nos tecidos adiposo e hepático. Além disso, o exercício leva a uma redução no estresse de retículo (demonstrado através de menor fosforilação de PERK e eIF2 α) nestes tecidos. Em paralelo, um aumento na sinalização de insulina foi observado, confirmado pelo aumento da atividade de IR, IRSs e Akt, após treinamento físico. Assim, os resultados sugerem que o exercício pode reduzir estresse de retículo e inflamação, melhorando a resistência à insulina no tecido adiposo e hepático.

Palavras-chave: Obesidade. Dieta hiperlipídica. Resistência à insulina. Estresse de retículo. Exercício físico.

ABSTRACT

Obesity affects millions of people around the planet, especially in Western countries, being recognized as an important public health issue worldwide. Besides the numerous behavioral and social aspects, obesity has been implicated in the increased morbidity and mortality due to association with various chronic non-communicable diseases such as diabetes mellitus type. In the context, of obesity is observed exacerbation of inflammatory cytokines and reticulum stress, which are related to induction of many metabolic disorders such as insulin resistance. The aim of this study was to investigate the effects of exercise training on inflammatory signaling, ER and insulin resistance in the adipose, and hepatic tissue of obese rats. Rats were fed with standard rodent chow (3948 kcal.kg⁻¹) or high fat diet (5358 kcal.kg⁻¹) for 2 months. After the rats were submitted to swimming training (1 hour per day, five days for week, with 5% overload of the body weight for 8 weeks). Samples from epididymal adipose tissue and liver were obtained and molecular analysis were performed by imunoblot. Our results showed that the protocol of exercise reduces proinflammatory molecules (JNK, IκB and NFκB) in adipose and hepatic tissue of obese rats. In addition, exercise leads to reduction in the reticulum stress (shown by lower phosphorylation of PERK and eIF2α) in these tissues. In parallel, an increase in insulin signaling was observed, as confirmed by increased activity of IR, IRSs, and Akt after physical training. Thus, the results suggest that exercise reduce reticulum stress, improving insulin resistance in adipose tissue and liver.

Keywords: Obesity. Fat diet. Insulin resistance. Reticulum stress. Physical exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Via da insulina.....	17
Figura 2 - Sinalização molecular da UPR	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt – Proteína quinase B

AP-1 – Ativador da proteína 1

ATF6 – Fator 6 ativador de transcrição

BiP – Proteína Ligadora de imunoglobulina

DCNT – Doenças Crônicas Não-Transmissíveis

DIO – Obesidade induzida por dieta

DM-2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

eIF2 α - Fator de iniciação da tradução eucariótico 2 α

ERAD - Sistema de degradação associado ao retículo endoplasmático

FoxO – Fatores de transcrições *Forkhead Box sub-group O*

GLUT4 - Transportador de glicose 4

GSK-3 - Glicogênio sintase quinase-3

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IMC – Índice de Massa Corporal

IR – Receptor de insulina

IRE - Enzima ativada por inositol

IRS1/2 – Substrato do receptor de insulina 1/2

ITT – Teste de tolerância à insulina

JNK – c-jun N-terminal quinase

K_{ITT} – Constante de decaimento de glicose

OMS – Organização Mundial da Saúde

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PERK - Quinase do retículo endoplasmático semelhante a proteína quinase do pâncreas

PGC-1 α - Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PI3K - Fosfatidilinositol 3 quinase

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

PKA - Proteína quinase A

RE - Retículo endoplasmático

REL - Retículo endoplasmático liso

RER - Retículo endoplasmático rugoso

RI – Resistência à insulina

S1P - Protease serina-1

S2P - Metaloprotease-2

SH2 – Domínios protéicos com homologia a Src2

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TNFR1 - Receptor 1 de TNF- α

UPR – Resposta à proteína não dobrada

XBP-1 - Proteína 1 ligada ao domínio X-box

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A epidemia global da obesidade.....	13
1.3 Via molecular da insulina	16
1.4 Mecanismos moleculares de resistência à insulina.....	19
1.5 Estresse de retículo	22
1.5 Efeitos moleculares do exercício físico	28
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. MANUSCRITO	36
4. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 A epidemia global da obesidade

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma epidemia global (IOTF, 2009). O aumento da prevalência da doença nas diversas regiões do planeta vem sendo apontado como um dos mais expressivos fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. A obesidade atinge intensamente os países desenvolvidos, porém estudos demonstram que a prevalência tem aumentado em todo mundo, inclusive no Brasil, onde é resultado da transição nutricional que vem ocorrendo nas últimas décadas. A obesidade é uma patologia complexa que compromete o indivíduo em dimensões fisiológicas, psicológicas e sociais, afetando pessoas de diferentes idades, sexos e condições socioeconômicas. Pesquisas sobre a obesidade vêm despertando os interesses de pesquisadores de todo mundo, sendo intensamente estudada em seus diversos aspectos (Boden, 2011; Friedman, 2000).

Do ponto de vista clínico, pode-se definir obesidade como a condição de elevado peso corporal, principalmente de gordura, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde (Kopelman, 2000). Como critério para o diagnóstico, a literatura utiliza amplamente o Índice de Massa Corporal (IMC), obtido por meio da fórmula que combina peso e altura. Segundo a OMS, o diagnóstico é feito da seguinte forma: sobrepeso, $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$; obesidade, $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$. A obesidade é classificada de acordo com a gravidade: obesidade grau I, $IMC \geq 30$ e $< 34,99 \text{ Kg/m}^2$; obesidade grau II com $IMC \geq 35$ e $< 39,99 \text{ Kg/m}^2$; obesidade grau III

com IMC ≥ 40 Kg/m² (WHO, 1995). O IMC > 30 Kg/m² e gordura depositada na região abdominal implicam em maiores riscos de problemas de saúde. A medida da circunferência da cintura ≥ 94 cm nos homens e ≥ 80 cm nas mulheres representa risco aumentado de complicações metabólicas. Já valores ≥ 120 cm no sexo masculino e ≥ 88 cm no sexo feminino indicam alto risco (IOTF, 2009).

Mundialmente, cerca de 1,2 bilhão de pessoas apresentam sobrepeso, enquanto 300 milhões são obesos (IOTF, 2009). Nos Estados Unidos da América, a prevalências de sobrepeso em torno de 66% nos adultos e obesidade de aproximadamente 33% (Ogden et al., 2006). Mais de 50% da população europeia entre 35 e 65 anos é classificada com sobrepeso ou obesa (Presscott-Clarke e Primatesta, 1998). Porém, a obesidade não é característica particular de países desenvolvidos. Foi apontado que a obesidade como um importante problema de saúde pública na América Latina, Caribe e Ásia (Popkin et al., 1994).

O peso corporal é regulado por interações entre fatores fisiológicos, bioquímicos, moleculares, genéticos, ambientais e psicossociais que atuam controlando a energia ingerida e a despendida. A obesidade resulta do consumo energético excessivo associado a sua menor demanda em longo prazo, estabelecendo-se balanço energético positivo. Embora, as bases genéticas transmissíveis da obesidade sejam inquestionáveis, isoladamente são insuficientes para explicar o alarmante aumento da incidência da patologia em todo mundo em curto espaço de tempo; tal aumento é melhor explicado pelas mudanças comportamentais ocorridas nas últimas décadas. As tendências genéticas à obesidade vêm apresentando maior expressão diante das transformações no padrão alimentar associado aos baixos níveis de atividades físicas observados na

sociedade, em consequência do processo de modernização (Morton et al., 2006; Stein e Colditz, 2004).

O balanço energético positivo associado ao alto consumo calórico e ao sedentarismo é responsável pela maior parte dos casos de obesidade em seres humanos. Dentre os fatores alimentares, é evidente que há um consumo energético excessivo, principalmente de fontes lipídicas saturadas. Além disso, o estilo de vida atual proporcionou a redução das atividades físicas que demandam energia. A transição nutricional, a ocidentalização dos padrões alimentares, o aumento excessivo do consumo de alimentos industrializados, ricos em gorduras e o sedentarismo tornaram a população predispostas a instalação do quadro de obesidade, precedida ou acompanhada, pelo quadro de resistência à insulina (RI) (Boden, 2011).

A preocupação com a obesidade se remete ao fato de ela estar associada à etiologia de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como diabetes *mellitus* tipo 2 (DM-2), hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, doenças cardiovasculares, neoplasias, acidente vascular cerebral e esteatose hepática não-alcoólica (Kopelman, 2000; Lewis et al., 2009). Este grupo de doenças é chamado de síndrome metabólica. Estudos têm demonstrado a associação entre obesidade e RI, que de fato, é o maior preditor para o desenvolvimento das inúmeras alterações metabólicas que compõe a síndrome (Stern et al., 2005).

Os mecanismos celulares de sinalização da insulina vêm sendo estudados há décadas no tecido muscular, hepático e adiposo, principais tecidos alvos deste hormônio (Saltiel et al., 2001). A insulina atua nestes tecidos promovendo efeitos metabólicos imediatos, que incluem: aumento da captação da glicose, especialmente nos tecido muscular e adiposo, síntese protéica, lipogênese e

glicogênese. Por outro lado, atua inibindo a gliconeogênese, proteólise e lipólise (Zhidan Wu et al., 2010).

O impacto negativo do aumento da quantidade de gordura corporal sobre a sensibilidade à insulina pode ser claramente demonstrado na maioria dos indivíduos obesos, assim como a redução da resistência ao hormônio é observada com a perda de peso e o exercício físico (De Souza et al., 2005). Diante disso, pesquisas estão sendo realizadas em todo mundo com o objetivo de descrever mecanismos que modulem a sensibilidade à insulina.

1.3 Via molecular da insulina

Para compreensão dos mecanismos moleculares atualmente relacionados à obesidade, faz-se necessário a caracterização da via molecular da insulina e seus efeitos fisiológicos.

A insulina é um hormônio peptídico composto por duas cadeias de aminoácidos, que através de complexos mecanismos é secretada no sangue pelas células β das Ilhotas de Langerhans do pâncreas. A liberação do hormônio, que tem meia vida de seis minutos, é estimulada em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Após 10 a 15 minutos é depurada da circulação (Youngren, 2007).

A sinalização intracelular da insulina inicia-se após a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR) (Figura 1). Trata-se de, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa (α) e duas subunidades beta (β) (Saltiel e Kahn, 2001). As

subunidades α encontram-se extracelularmente, enquanto as subunidades β são proteínas transmembranas. A insulina liga-se a porção α do seu receptor,

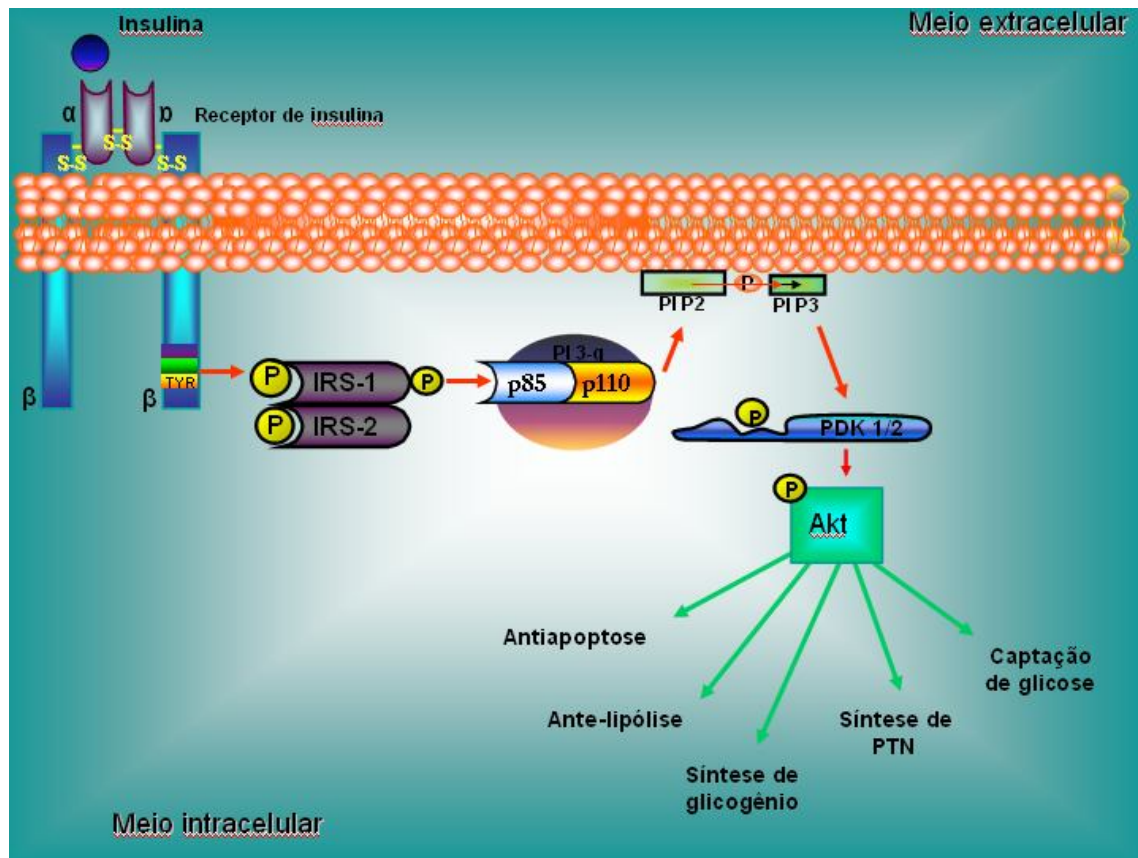


Figura 1 - Via molecular da insulina 1

estimulando a autofosforilação cruzada das porções β , que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca. A partir deste evento, o IR torna-se apto a levar adiante a transdução do sinal de insulina. A ativação do IR estimula a fosforilação em tirosina de diversos substratos, entre eles, o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2) (Hotamisligil et al., 1996). A fosforilação das proteínas IRSs leva a criação de sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A PI3K é fundamental na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina. É um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85).

A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio proteico com homologia a Src 2 (SH2), da subunidade p85 da PI3K ativa o sítio catalítico associado (Saad et al., 1997; Backer et al., 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3 fosfato, fosfatidilinositol-3,4 difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina da proteína serina/treonina quinase B (Akt) (Alessi e Cohen, 1998).

A Akt atua aumentando a captação periférica de glicose principalmente no tecido muscular e adiposo por aumentar a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs), do citoplasma para a membrana plasmática, o que resulta em captação celular de glicose por difusão facilitada após a ingestão alimentar (Abel et al., 2001). No tecido adiposo, a Akt apresenta função antilipolítica, por meio do qual inibe a liberação de ácidos graxos dos adipócitos. A insulina inibe a proteína quinase A (PKA), ativando a fosfodiesterase AMP cíclico específica (PDE38), que reduz os níveis de AMP cíclico nos adipócitos, resultando na inibição da enzima lipase hormônio sensível (Sutherland et al., 1996; Thirone et al., 2004).

Já no tecido hepático o hormônio atua na manutenção do equilíbrio de glicose plasmática, sendo estimulado de acordo com o estoque de nutrientes disponíveis no organismo (Alessi e Cohen, 1998; Cartee e Dean, 1994). A insulina inibe a produção hepática de glicose por inibir a gliconeogênese e glicogenólise. O hormônio inibe a gliconeogênese por meio de vias de sinalização que envolvem fatores de transcrição da família *forkhead* (FoxO) e o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma, PGC-1. Com isso, observa-se a inibição da transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase. Por outro lado, aumenta a transcrição

de genes de enzimas glicolíticas como glicoquinase e piruvato quinase (Sakakura et al., 2001).

Ainda, a insulina estimula a glicogênese em músculo e fígado. Este evento é resultado da desfosforilação da enzima glicogênio-sintetase. Quando ativada, a Akt fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), diminuindo a fosforilação da glicogênio-sintase e aumentando sua atividade. A insulina também é capaz de desfosforilar a glicogênio sintase diretamente, ativando a proteína fosfatase 1, via PI3K (Campbell et al., 1988; Cross et al., 1995).

1.4 Mecanismos moleculares de resistência à insulina

Define-se como resistência à insulina o fenômeno biológico de resistência aos efeitos desse hormônio. Neste quadro clínico, observa-se concentração elevada de insulina em detrimento da quantidade necessária para a estimulação das células (Stern et al., 2005). Defeitos nos mecanismos moleculares de sinalização da insulina, como serão descrito a seguir, levam à resistência a este hormônio.

A partir da descoberta da insulina, em 1922, doenças relacionadas à deficiência de ação deste hormônio foram atribuídas à reduzida secreção insulínica. Porém, uma década depois, Himsworth (1936) estudando pacientes diabéticos, propôs que a fisiopatologia da doença estaria relacionada à prejudicada sensibilidade à insulina e não a deficiência de secreção do hormônio. Posteriormente, consolidou-se a relação entre DM-2, resistência insulínica e outras DCNT (Lumeng e Saltiel, 2011). Após a caracterização da atividade tirosina quinase do IR e da sua capacidade de transdução do sinal da insulina, identificou-se, em

quadros clínicos de resistência à insulina, a redução da fosforilação de proteínas da via de transdução desse hormônio, tais como IR, IRS-1 e IRS-2 (Asante-Appiah e Kennedy, 2003). Mecanismos moleculares associados a uma redução da fosforilação em tirosina de proteínas envolvidas na sinalização da insulina passaram a ser o foco da investigação da fisiopatologia envolvida na gênese da obesidade e doenças relacionadas. Neste contexto, identificou-se que tais proteínas com atividade tirosina quinase podem ser fosforiladas em resíduos serina, e tal fenômeno pode levar a uma atenuação do sinal molecular gerado pela ligação da insulina ao seu receptor (Gregor e Hotamisligil et al., 2011; Alessi e Cohen, 1998), caracterizando o principal mecanismo de resistência à insulina descrito na literatura.

A obesidade vem sendo estritamente associada à inflamação subclínica crônica caracterizada por produção anormalmente elevada de citocinas, aumento de proteínas de fase aguda e ativação de complexas vias de sinalização na maioria dos indivíduos. Estudos sugerem que a liberação de citocinas pró-inflamatórias são importantes mediadores das alterações na sinalização intracelular de insulina (Gregor e Hotamisligil, 2011; Prada et al., 2005).

A obesidade e a ingestão de dieta hiperlipídica à base gordura saturada são fatores de risco no desenvolvimento de resistência à insulina e DM-2, causando aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e acúmulo excessivo de gordura corporal. Estudos apontam a relação da resistência à insulina à diversos fatores, como: hormônios derivados dos adipócitos, a via inflamatória e, recentemente, o estresse de retículo (Bastard et al., 2006; Hotamisligil et al., 1996; Ron, Walter, 2007). Contudo, a relação entre lipídeos e resistência à insulina é complexa e o preciso mecanismo ainda não foi completamente elucidado.

Estudos têm revelado a ligação entre vias pró-inflamatórias e vias que regulam o metabolismo, em especial, aquelas ativadas em resposta à insulina. As citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a Interleucina 1 beta (IL-1 β) parecem desempenhar um papel central nestas conexões. O TNF- α liga-se ao seu receptor (TNFR1), resultando na ativação de substratos intracelulares envolvidos no controle da transcrição de genes de resposta inflamatória, regula proteínas relacionadas ao controle de apoptose e modula respostas de crescimento e diferenciação celular em diversos tecidos (Amaral et al., 2006; Gupta, 2002; Hotamisligil et al., 1996). Uma das principais moléculas intermediárias da via de sinalização do TNF- α é a serina quinase JNK (c-jun N-terminal quinase). Quando ativada, a JNK tem a função primária de promover a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, resultando na formação do fator de transcrição dimérico ativador da proteína 1 (AP-1) (Dempsey et al., 2003; Macewan, 2002). Porém, a atividade serina quinase da JNK pode também atuar sobre outros substratos, inclusive as moléculas da via da insulina, como IRS-1 e IRS-2 (Aguirre et al., 2000; Shoelson e Lee, 2003). Quando fosforiladas em serina pela JNK, a possibilidade de fosforilação em tirosina pelo receptor de insulina é prejudicada, o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através da cascata (Hirosumi et al., 2002; Tuncman et al., 2006).

Os substratos do receptor de insulina também podem sofrer fosforilação em serina por ação de outra via pró-inflamatória, a via IKK/I κ B/NF- κ B. Esta via pode ser ativada pelo TNF- α , assim como por outras citocinas pró-inflamatórias. A ativação da IKK induz a dissociação do complexo I κ B/NF κ B, porém também pode promover a fosforilação em serina dos IRSs, ação que compromete a transdução do sinal da insulina através desta via (Deng et al., 2004). Foi demonstrado que a inibição da

ativação da via IKK/I κ B/NF- κ B com uso do anti-inflamatório ácido acetil salicílico (AAS) reverte a resistência à insulina promovida por sinais pró-inflamatórios ou por sepse (Griffin et al. 1999; Shoelson e Lee, 2003). Diversos estudos têm defendido que o exercício físico também pode modular as proteínas pró-inflamatórias (Goodyear, 1998; Karabey, 2005). Respostas crônicas ao exercício aeróbico resultaram em menores concentrações de PCR, IL-6 e TNF- α (Barbeau et al., 2000).

1.5 Estresse de retículo

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela presente em células eucarióticas e pode ser classificado em dois tipos morfológicos, que apresentam função organizacional distintas: retículo endoplasmático rugoso (RER) e retículo endoplasmático liso (REL). Ambos são constituídos por um sistema membranoso que se ramifica ao longo do citoplasma, comunicando o espaço perinuclear, complexo de Golgi e lisossomos, por meio de vesículas. A característica marcante do RER é a presença de ribossomos aderidos a sua membrana (Carvalho e Recco-Pimentel, 2007).

O RER é o principal local de enovelamento de proteínas na célula. Este processo de enovelamento é composto por uma série de mecanismos como: dobramento, montagem, formação de pontes dissulfetos e glicosilação de proteínas. O dobramento de proteínas é um processo importante e responsável pela conversão de cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, permitindo que as proteínas tornem-se funcionais. Perturbações no metabolismo celular podem prejudicar o dobramento ideal, formando proteínas imaturas (Ron e Walter, 2007).

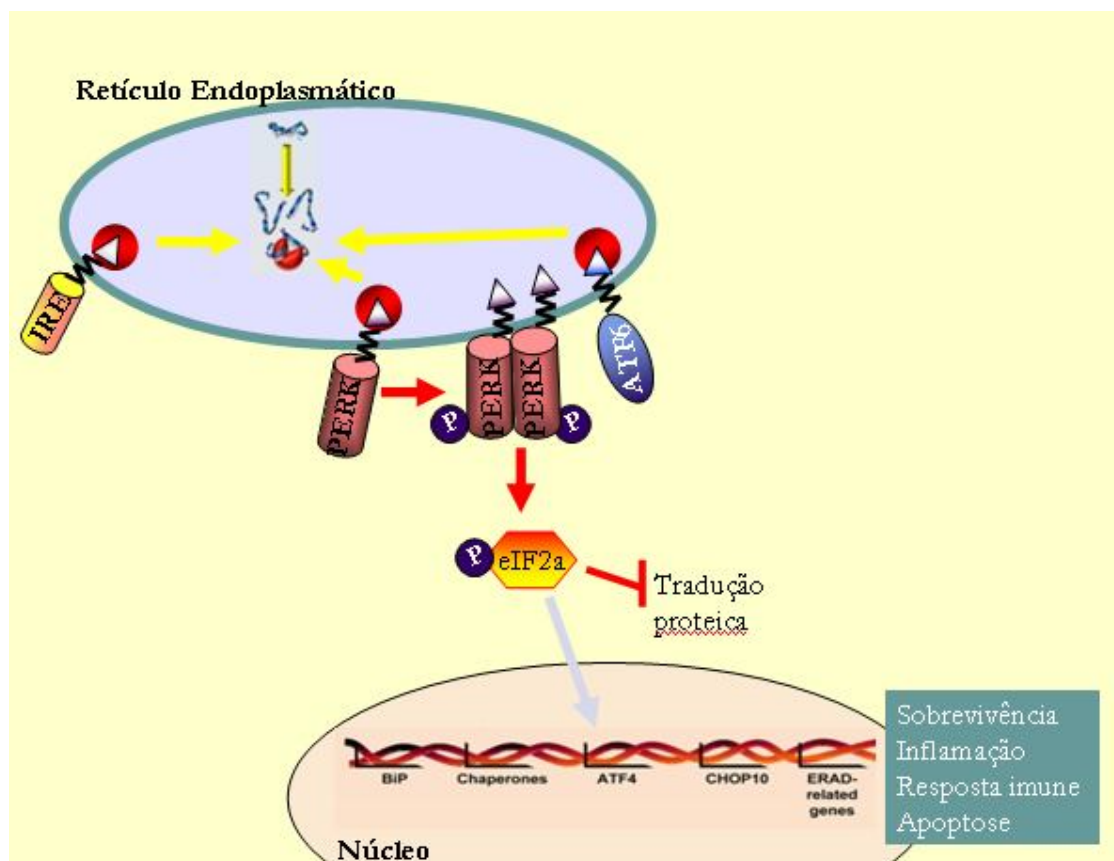


Figura 2 -Sinalização molecular da UPR

Distúrbios na síntese proteica no RE, em particular o aumento da síntese de proteínas imaturas, também conhecidas como proteínas *unfolded* (não dobradas) e *misfolded* (mal dobradas), acionam uma resposta adaptativa elaborada conhecida como a UPR (resposta à proteína não dobrada) (Ron e Walter, 2007). A UPR é caracterizada por uma cascata de sinalização com finalidade de resgatar a qualidade da síntese proteica, atenuando a síntese global de proteínas, aumentando a expressão de chaperonas e quinases dobradoras de proteínas e ativando o ERAD (sistema de degradação associado ao RE). Desequilíbrios na sinalização da UPR podem ocasionar o “estresse de retículo”, ocorrência que pode estar associada à doenças, tais como obesidade e diabetes *mellitus* (Boden et al., 2008).

Nas células eucarióticas, o monitoramento da função reticular e sinalização da UPR são mediados por três proteínas associadas à membrana do RE: PERK (quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas), IRE1 (enzima ativada por inositol 1) e ATF6 (Fator 6 ativador de transcrição). A ativação destas proteínas promove uma cascata de sinalização intracelular que pode resultar na redução dos fatores de iniciação de tradução, assim como elevação da transcrição gênica (Calfon et al., 2002; Chen et al., 2002; Cullinan e Diehl, 2006). Essas alterações têm por finalidade reverter o estado de estresse de retículo por reduzir a atividade ribossomal.

Em situação fisiológica, as três proteínas de membranas permanecem inativas, pois estão associadas a uma chaperona BiP (*Binding Protein*), em seus domínios intraluminais (amino-terminal de IRE1 e PERK e carboxi-terminal de ATF6) (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2005). Entretanto, em situação de estresse, como o acúmulo de proteínas imaturas no RE, observa-se o recrutamento das chaperonas que desligam-se das três proteínas de membrana, permitindo a homodimerização e auto-fosforilação das quinases PERK e IRE1 e clivagem do ATF6. A cascata de sinalização ativada a partir destes eventos poderá resultar em efeitos biológicos de sobrevivência (aumento da expressão de chaperonas) e, até mesmo, pró-apoptóticos (aumento da expressão de CHOP e *X-box binding protein-1* (XBP-1) e clivagem da pro-caspase 12) (Calfon et al., 2002; Ma et al., 2002).

A ativação de ATF6, na UPR, requer a atuação do complexo de golgi, onde é clivada pela protease serina-1 (S1P) e a metaloprotease-2 (S2P) liberando um fator de transcrição ativo no citossol. A ATF6 é capaz de induzir a ativação transcricional do gene XBP-1. O XBP-1s traduzido liga-se ao promotor de genes que codificam chaperonas e proteínas associadas à degradação proteica (ERAD) (Chen

et al., 2002). O recrutamento das chaperonas resulta, também, na oligomerização da IRE1, levando a justaposição e autofosforilação dos domínios quinases presentes na porção citoplasmática, ativando a porção endonuclease no lúmen do RE (Ron e Walter, 2007). A endoribonuclease IRE1 atua clivando e ativando o fator de transcrição XBP-1 e chaperonas. A função da IRE1 também está associada a redução da tradução global e fluxo de proteínas novas para o RE (Sidrauski e Walter, 1997).

Já o resultado da ativação da PERK, na UPR, é a inibição generalizada do aporte de proteínas no RE. A PERK, quando liberada da chaperona BiP sofre dimerização e autofosforilação, tornando-se ativa. A ativação da PERK resulta na fosforilação de sua proteína alvo, a eIF2 α (fator de iniciação da tradução eucariótico 2 α) no resíduo serina 51 (Zhang et al., 2002). Os mecanismos de iniciação da tradução são complexos e envolvem inúmeras proteínas eIFs. A função do eIF2 α é associar-se ao RNA transportador (RNAt) e a uma molécula de GTP com a finalidade de mediar a ligação do RNAt (carregado com o aminoácido metionina) à subunidade ribossomal 40S. Em quadros de estresse, tais como estresse de RE, observa-se a redução da tradução global de proteínas em decorrência da menor fosforilação da subunidade α do eIF2 pela PERK, inibição da troca de GDP por GTP, resultando na não formação do complexo ternário eIF2 α /GDP/RNAt (Cullinan et al., 2003).

Os mecanismos supracitados ocorrem com a finalidade de proteger as células da morte, reduzindo a síntese de proteínas em geral e aumentando a produção de chaperonas que atuam no dobramento de proteínas no lúmen da organela. Porém, com a persistência do quadro de UPR, os mecanismos citados não são suficientes para a diminuição de proteínas mal formadas, resultando na

apoptose. Descreveu-se que a UPR excessivamente ativa promove a morte celular por aumentar a expressão de genes envolvidos na apoptose, como CHOP e C/EBP *protein homolog* (Ma et al., 2002).

Vem sendo proposto que as vias JNK/AP1 e IKK/IkB/NF- κ B são intensamente ativadas pela UPR. No elegante estudo de Nakamura (2010), ao relacionar nutrientes, estresse de RE e inflamação, foi demonstrado que a eIF2 α , que é ativada pela PERK, desempenha uma função exclusiva. A PERK é significativamente ativada por lipídeos e na obesidade, desempenhando papel crítico na ativação da JNK e da resposta inflamatória. No contexto da inflamação crônica, evidências apontam que células como adipócitos e hepatócitos podem estar ligadas a um conjunto diversificado de respostas do estresse de RE, que podem ocasionar respostas imunes aumentadas. De fato, em tecidos adiposo e hepático de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica, a fosforilação da PERK e IRE1 α e expressão da JNK estão significativamente aumentadas em comparação com animais magros (Ozcan et al., 2004). Da mesma forma, em roedores com obesidade resultante de deficiência de leptina (ob/ob), os tecidos adiposo e hepático apresentam características do quadro de estresse RE, incluindo aumento dos níveis de PERK e IRE1 α fosforiladas, assim como aumento da atividade da JNK (Tuncman et al., 2006).

A relação entre o estresse de RE e a susceptibilidade à resistência à insulina foi demonstrada, primeiramente, *in vitro*. Células manipuladas geneticamente com deficiência de XBP1 cultivadas demonstraram resistência ao hormônio por mecanismos que envolvem JNK1 e fosforilação em serina [307] do IRS1 (Lee et al., 2008). Foram descritos diversos mecanismos que relacionam o estresse de RE e a resistência à insulina. Duas importantes moléculas ativas no

estresse de RE, PERK e eIF2 α foram apontadas na fisiopatologia da resistência à insulina e DM-2, em roedores obesos, por mecanismos dependentes de JNK (Ozcan et al., 2004). Por outro lado, o estímulo da função do RE em camundongos transgênicos ou administração de chaperonas químicas protegem contra a resistência à insulina induzida por dieta (Zhang et al., 2008). O estresse de retículo contínuo também pode favorecer a ativação da JNK por meio da formação do complexo ternário IRE1/TRAF2/ASK1 implicado em mecanismos de morte celular (Hu et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrado que a NF- κ B pode ser ativado pela UPR por meio da supressão de transcrição de I κ B, por um mecanismo que envolve a PERK, resultando na regulação de mediadores da inflamação, como IL-6 e TNF- α (Deng et al., 2004). Também demonstrou-se que a relação entre estresse de RE e inflamação não é unilateral. O estresse de RE é capaz de ativar a via inflamatória por meio da UPR, assim como evidências demonstram que os mediadores inflamatórios, tais como a JNK e IKK podem ter um impacto negativo sobre a função do RE. Este círculo vicioso dá suporte para que o quadro persista de forma intensa (Urano et al., 2000).

Como descrito anteriormente, as vias inflamatórias desempenham uma função importante em defesa do organismo, entretanto, quando excessivamente ativas podem fosforilar em serina moléculas da via da insulina, levando à resistência ao hormônio. Neste contexto, fatores indutores e perpetuadores de inflamação, como o estresse de RE emergem como um importante foco de estudo para a prevenção e tratamento da resistência à insulina e doenças relacionadas. Inúmeras estratégias vêm sendo estudadas para reduzir a ativação descontrolada da via

inflamatória e estresse de retículo com o objetivo prevenir e tratar a resistência à insulina e obesidade, melhorando a homeostase de glicose.

1.5 Efeitos moleculares do exercício físico

A obesidade é determinada pela associação de inúmeros fatores, e esta multicausalidade dificulta seu tratamento. Diante disso, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas terapêuticas vêm despertando os interesses de pesquisadores de todo mundo. Por ser uma doença crônica e multifatorial exige um tratamento longo e metucioso. Atualmente, o tratamento da obesidade baseia-se na terapia farmacológica, psicológica e nutricional, cirurgia e prática de exercícios físicos. Entretanto, prevenir o ganho de peso é mais eficiente em comparação a métodos de redução do peso (Boden, 2011).

Está claramente estabelecida na literatura a relação entre a prática de exercícios físicos e qualidade de vida. Por outro lado, o estilo de vida sedentário é um fator que contribui para o desenvolvimento ou aumento da resistência à insulina. O exercício físico vem sendo recomendado com o objetivo de recuperar a saúde e o bem estar físico e emocional, garantindo ao indivíduo a melhora da qualidade de vida por meio da perda gradativa de peso ponderal e reversão das alterações metabólicas e hormonais (Hayashi et al., 1997; Fallon et al., 2001). A prática de exercício físico contribui favoravelmente com o sistema circulatório, respiratório, imunológico, entre outros, e reduzindo os fatores deletérios ao organismo (Goodyear e Kahn, 1998; Barbeau et al., 2002). Em longo prazo, a prática de exercícios físicos está relacionada à redução da incidência de osteoporose, osteoartrite, HAS, dislipidemias, DM e outros. Além disso, vem se demonstrando o efeito anti-inflamatório do exercício (Sudi et al., 2001; Karacabey, 2005).

O exercício físico é considerado uma das pedras angulares do tratamento e prevenção do diabetes *mellitus* do tipo 2. As primeiras evidências do efeito favorável do processo de contração muscular na captação da glicose surgiram em 1887, quando Chauveau e Kaufman (1887) relataram a redução dos níveis de glicose proveniente da musculatura de masseter de cavalos durante a mastigação. Em 1924, foi demonstrado por Burn e Dale que a insulina tem o mesmo efeito do exercício na indução de captação de glicose pelos músculos. Estes estudos originaram uma série de investigações com o objetivo de elucidar a possível interação entre a ação da insulina e exercício na regulação da homeostase de glicose.

Em 1970, Bjorntorp e colaboradores demonstraram melhora da tolerância à glicose associada a menores níveis de insulina em voluntários praticantes de exercícios físicos quando comparados aos voluntários sedentários. Este mesmo grupo demonstrou que mulheres com hiperinsulinemia associada à obesidade apresentaram diminuição dos níveis de insulina no plasma após 6 semanas de exercícios físicos. Tais descobertas sugeriram que o exercício regular aumenta a sensibilidade à insulina no músculo e em outros tecidos, dados que foram confirmados uma década depois por Mondon et al., 1980.

Com a confirmação do papel benéfico do exercício físico na ação metabólica da insulina, inúmeros estudos buscaram elucidar quais são os mecanismos moleculares pelo qual o exercício atua como estimulador fisiologicamente relevante da homeostase de glicose em diferentes tecidos. A atividade física regular está relacionada ao aumento da sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal. Este efeito é resultado do aumento da expressão e atividade das moléculas que compõe a via de sinalização da insulina

em diferentes tecidos (Teran-Garcia et al., 2005; Shenk e Horowitz, 2007; Pauli et al., 2008).

Durante o exercício, o aumento do fluxo sanguíneo pode resultar em maior disponibilidade de insulina para os tecidos periféricos, contribuindo para a maior captação de glicose. No entanto, o efeito mais marcante do exercício físico é a potencialização da transdução do sinal insulínico. O exercício pode potencializar o efeito da insulina por meio do aumento da fosforilação do IRS-2, com conseqüente aumento da atividade da PI3K (Backer et al., 1992). Resultados mostraram que o exercício físico aeróbio melhora a sensibilidade à insulina, aumentando a fosforilação do IRS-1/2 bem como a associação dessas proteínas com a PI3K em animais estimulados com insulina quando comparados aos animais controles (Luciano et al., 2002).

Em ratos diabéticos, foi demonstrado que o exercício físico promove o aumento da atividade da Akt, a proteína distal da via da insulina, fundamental para iniciar a translocação do transportador de glicose, GLUT4, para a membrana citoplasmática no músculo esquelético. Animais deficientes de Akt, pela técnica *knockout*, demonstraram características de diabetes severo, tais como hipertrofia das células beta, aumento na produção hepática de glicose, diminuída homeostase da glicose e exacerbada hiperglicemia (Hayashi et al., 1997).

Diversos grupos de pesquisa têm investigado os efeitos do treinamento físico a longo prazo durante várias semanas sobre as alterações hepática em roedores, a maioria realizada com animais obesos e hiperglicêmicos. Esses estudos apontam a regulação de moléculas e enzimas hepáticas envolvidas na regulação da produção hepática de lipídeos e glicose. O exercício físico promove grande impacto no

metabolismo hepático demonstrada pela expressão e atividade molecular alterada, prevenção da hiperglicemia e esteatose hepática. Estudos do grupo apontaram que o exercício agudo melhora a homeostase da glicose e RI de forma associada ao aumento da fosforilação da Akt e FoxO e diminuição dos níveis de HNF-4 α no fígado de camundongos obesos em condição de jejum. Esses fenômenos foram acompanhados por uma redução na expressão de enzimas que regulam a gliconeogênese, como PEPCK e G6Pase. De forma interessante, o inibidor da PI3K (LY29004) reverteu o efeito agudo do exercício sobre a hiperglicemia de jejum, confirmando o envolvimento da via PI3K (De Souza et al., 2010; Sutherland et al., 1996).

O papel anti-inflamatório do exercício físico na obesidade tem sido amplamente relatado, com foco nas significativas alterações moleculares na via de sinalização da insulina. Apontou-se que respostas pró-inflamatórias induzidas pelo exercício agudo, porém demonstrou-se efeitos antiinflamatórios significantes se envolvendo exercícios crônicos (Kinagawa et al., 2006). Também se demonstrou a relação entre sedentarismo e inflamação sistêmica de baixo grau em voluntários saudáveis jovens e idosos (Bruunsgaard et al., 2003). Estudos longitudinais apontaram que o exercício físico reduziu significativamente os níveis de PCR (Mattusch et al., 2000; Fallon et al., 2001), sugerindo que o exercício físico crônico pode diminuir a inflamação sistêmica de baixo grau.

Estudos examinaram os efeitos do exercício sobre a sinalização inflamatória. Estudos recentes relataram que o exercício suprime a produção de TNF- α em camundongos com ausência do receptor de TNF (Keller et al., 2004; Stensberg et al., 2003). O TNF- α promove a ativação da via IKK/I κ B/NF- κ B. Estas citocinas têm sido amplamente estudadas em sua relação com a ação da insulina e múltiplos

efeitos tem sido descritos, incluindo a inibição da via de sinalização do receptor de insulina. Foi demonstrado que a expressão gênica do TNF- α no tecido adiposo apresenta-se elevado em indivíduos obesos comparado aos eutróficos. Diversos mecanismos estão envolvidos nesta ação do TNF- α de promover resistência à insulina, tais como: aumento da liberação de ácidos graxos pelos adipócitos; inibição da síntese e secreção de adiponectina; e ainda aumento da fosforilação em serina de moléculas importantes da via da insulina, levando a menor captação de glicose e aumento da gliconeogênese (Barbeau et al., 2002).

A melhora da sensibilidade à insulina foi associado à redução na atividade JNK no músculo esquelético em humanos após uma única sessão de exercício (Schenk e Horowitz, 2007). Sriwijitkamol e colegas (2006) mostraram que oito semanas de treinamento aeróbio reduziu a sinalização de I κ B/NF- κ B no músculo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. As alterações na via inflamatória, promovida pelo exercício físico na obesidade são foco de muitos estudos, entretanto os mecanismos envolvidos necessitam ser elucidados.

É sabido que alguns dos mecanismos moleculares de resistência à insulina envolvem alterações nas moléculas-chave de vias de sinalização intracelulares, tais como JNK e NF- κ B (Aguirre et al. 2000; Hirosumi et al. 2002; Lee et al. 2003). Além disso, as evidências atuais têm demonstrado que um dos mecanismos patológicos da resistência à insulina é derivado de comprometimento da função do retículo endoplasmático, um processo conhecido como o estresse de RE. As mais importantes moléculas de estresse do RE são PERK e eIF2 α . Recentemente, o estresse de RE vem emergindo como um importante alvo de estudos relacionado à inflamação e RI. Ozcan e colegas (2004) mostraram que, na obesidade, o dano do estresse de RE na ação da insulina é dependente da ativação de JNK.

Dessa forma, é consenso que citocinas inflamatórias atuam sobre a via de sinalização de insulina, levando à resistência a esse hormônio. Por outro lado, o exercício físico pode melhorar a sensibilidade à insulina por meio de efeitos no fígado e no tecido adiposo (Zinker et al., 1994) por reduzir o *status* inflamatório. Além disso, as evidências atuais têm demonstrado que um dos mecanismos patológicos da resistência à insulina é derivado de comprometimento da função do retículo endoplasmático, um processo conhecido como o estresse de RE. Entretanto não é conhecido se a modulação do estresse de RE pelo exercício físico está relacionado aos efeitos de melhorar a sensibilidade à insulina e a diminuição do *status* inflamatório nos tecidos adiposo e hepático.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do exercício na sinalização inflamatória, estresse de retículo e resistência à insulina no tecido adiposo e hepático de ratos obesos por dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os impactos da dieta hiperlipídica no peso corporal e do tecido adiposo epididimal e sensibilidade periférica à insulina de ratos;
- Avaliar efeitos do exercício físico na atividade de moléculas da via de sinalização da insulina (pIR, pIRS1 ou pIRS2 e pAkt) no tecido adiposo e hepático de ratos obesos;

- Avaliar efeitos do exercício físico na via inflamatória (pJNK, pI κ B e NF κ B) em tecido adiposo e hepático de ratos obesos;
- Avaliar os efeitos do exercício físico na fosforilação de proteínas sinalizadores de estresse de retículo (pPERK e p $\text{eIF2}\alpha$) em tecido adiposo e hepático de ratos obesos.

3. MANUSCRITO

Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats

Publicado no

European Journal Applied Physiology

Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats

Gabrielle da Luz · Marisa J. S. Frederico · Sabrina da Silva · Marcelo F. Vitto ·
Patricia A. Cesconetto · Ricardo A. de Pinho · José R. Pauli · Adelino S. R. Silva ·
Dennys E. Cintra · Eduardo R. Ropelle · Cláudio T. De Souza

Received: 1 October 2010 / Accepted: 21 December 2010 / Published online: 20 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Obesity-induced endoplasmatic reticulum (ER) stress has been demonstrated to underlie the induction of obesity-induced JNK and NF- κ B activation inflammatory responses, and generation of peripheral insulin resistance. On the other hand, exercise has been used as a crucial tool in obese and diabetic patients, and may reduce inflammatory pathway stimulation. However, the ability of exercise training to reverse endoplasmatic reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obesity has not been investigated in the literature. Here, we demonstrate that exercise training ameliorates ER stress and insulin resistance in DIO-induced rats. Rats were fed with standard rodent chow (3,948 kcal kg⁻¹) or high-fat diet (5,358 kcal kg⁻¹) for 2 months. After that rats were submitted to swimming training (1 h per day, 5 days for week with 5% overload of

the body weight for 8 weeks). Samples from epididymal fat and liver were obtained and western blot analysis was performed. Our results showed that swimming protocol reduces pro-inflammatory molecules (JNK, I κ B and NF- κ B) in adipose and hepatic tissues. In addition, exercise leads to reduction in ER stress, by reducing PERK and eIF2 α phosphorylation in these tissues. In parallel, an increase in insulin pathway signaling was observed, as confirmed by increases in IR, IRSs and Akt phosphorylation following exercise training in DIO rats. Thus, results suggest that exercise can reduce ER stress, improving insulin resistance in adipose and hepatic tissue.

Keywords ER stress · Insulin resistance · Exercise training · Inflammatory pathway

Communicated by Klaas R. Westerterp.

G. da Luz · M. J. S. Frederico · S. da Silva ·
M. F. Vitto · P. A. Cesconetto · R. A. de Pinho ·
C. T. De Souza (✉)
Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade
do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC 88806-000, Brazil
e-mail: ctsouza@unesc.net

J. R. Pauli
Department of Bioscience, UNIFESP, School of Physical
Education, Federal University of São Paulo, Santos, SP, Brazil

A. S. R. Silva
School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto,
University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

D. E. Cintra · E. R. Ropelle
Faculty of Applied Sciences, University of Campinas—
UNICAMP, Limeira, SP, Brazil

Introduction

Obesity is associated with chronic low-grade inflammation (Bray 2004; Hotamisligil 2008). Activation of serine kinases in obesity and their involvement in insulin action illustrates the close relationship between metabolic and immune pathways; in particular, c-jun N-terminal kinase (JNK) (Hotamisligil 2008) and I kappa β kinase (IKK β) (Hirosumi et al. 2002; Shoelson et al. 2003). Together, JNK and IKK β might serve as an inhibitor of insulin signaling, by inducing inhibitory serine 307 (Ser307) phosphorylation of IRS1 (Aguirre et al. 2000). IKK is a serine kinase; and its activation phosphorylates I kappa β kinase (IKK β)/inhibitor of κ B (I κ B). After phosphorylation, I κ B is ubiquitinated and degraded in the proteasome, releasing nuclear factor κ B (NF- κ B) for the translocation to the nucleus and activation of gene expression (Cai et al. 2004). It has been proposed that increased NF- κ B activation may

play an important role in the pathogenesis of insulin resistance (Ragheb et al. 2008).

Recent studies provide an intriguing link between metabolic inflammation, endoplasmic reticulum (ER) stress and insulin resistance. It has been proposed that JNK and IKK β activation was associated with altered endoplasmic reticulum function and insulin resistance (Ozcan et al. 2004; Zhang et al. 2008). The two major molecules/markers of ER stress are PERK and eIF2 α . Ozcan et al. (2004) showed that, in obesity, the damage to ER function results in insulin resistance and type 2 diabetes, which are dependent upon JNK activation. In contrast, the enhancement of ER function in transgenic mice or the use of chemical chaperones protects against diet-induced insulin resistance. In addition, the forced activation of IKK β /NF- κ B increased ER stress and interrupted central insulin/leptin signaling (Zhang et al. 2008). Thus, strategies to reduce the aberrant activation of inflammatory signaling and ER stress are of great interest to improve insulin action and glucose homeostasis.

Physical exercise has been linked to improved glucose homeostasis and enhanced insulin sensitivity in humans (Zierath 2002; Frosig et al. 2007) and rodents (Ropelle et al. 2006; Pauli et al. 2008). The improvement in insulin sensitivity was associated with the reduction in JNK activity in the skeletal muscle in humans after a single bout of exercise (Schenk and Horowitz 2007). JNK phosphorylation was reduced after resistance exercise in old men (Williamson et al. 2003). Several studies have examined the effects of exercise on inflammatory signaling. Sriwijitkamol and colleagues showed that 8 weeks of aerobic exercise training reduced I κ B/NF- κ B signaling in muscle from subjects with type 2 diabetes (Sriwijitkamol et al. 2006). However, the impact of exercise on ER stress remains to be better understood. Thus, the current study was designed to investigate the effects of exercise training on inflammatory signaling, ER and insulin resistance in the adipose, and hepatic tissue of obese rats.

Materials and methods

Experimental animals and diet

Male Wistar rats bred in the University of Southern Santa Catarina were used in the investigation. All experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Southern Santa Catarina, UNESC. The 4-week-old Wistar rats were divided into four groups: control rats (C) fed on standard rodent chow, control rats submitted to 8-week-endurance training with workload (C + ET), obese rats fed on an obesity-inducing diet for 2 months (DIO) (Table 1), and DIO rats submitted to 8-week endurance

Table 1 Components of high fat and chow diet

Ingredients	Standard chow		High-fat diet	
	(g kg ⁻¹)	(kcal kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(kcal kg ⁻¹)
Comstarch (QSP)	398	1,590	116	462
Casein	200	800	200	800
Sucrose	100	400	100	400
Dextrinated starch	132	528	132	528
Lard	–	–	312	2,808
Soybean Oil	70	630	40	360
Cellulose	50	–	50	–
Mineral mix	35	–	35	–
Vitamin mix	10	–	10	–
L-Cystine	3	–	3	–
Choline	2.5	–	2.5	–
Total	1,000	3,948	1,000	5,358

training with workload (DIO + ET). The control rats were maintained sedentary throughout the experimental period and the trained rats were submitted to 1 h daily swimming sessions in water at 32°C, with an attached weight corresponding to 5% of body weight. Training occurred 5 days/week for 8 weeks. The rats were allowed free access to standard rodent chow or high-fat diet and water.

Fasting glucose, insulin tolerance test (ITT), serum insulin and TNF α quantification

After 24 h of the last exercise session and 6 h of fasting, eight (8) rats per group were submitted to an insulin tolerance test (ITT; 1.5 U/kg). Briefly, 1.5 IU/kg of human recombinant insulin (Humulin R) from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) was injected intraperitoneally in anesthetized mice and blood samples were collected from the tail at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min for serum glucose determination. The rate constant for plasma glucose disappearance (K_{ITT}) was calculated using the formula $0.693/\text{biological half life } (t_{1/2})$ (Bonora et al. 1989). Plasma glucose level was determined by a colorimetric method using a glucose meter (Advantage, Boehringer Mannheim, Irvine, USA). Plasma was separated by centrifugation (1,500g) for 15 min at 4°C and stored at –80°C until assay. Radioimmunoassay (RIA) was employed to measure serum insulin, according to a previous description (Scott et al. 1981). Serum TNF α concentration was measured by ELISA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's recommendations.

Killing of the animals

The rats were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of sodium thiopental (40 mg kg⁻¹). In all

experiments, the appropriateness of anesthesia depth was tested by evaluating pedal and corneal reflexes, throughout the experimental procedure. Following the experimental procedures, the rats were killed under anesthesia (thiopental 200 mg kg⁻¹), following the recommendations of the NIH publication no. 85–23.

Protein analysis by immunoblotting

As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the cava vein exposed, and 0.2 mL of normal saline (–) (5 rats per group) or insulin (10⁻⁶ mol L⁻¹) (+) were injected (5 rats per group). After insulin injection (only for insulin pathway analysis), hepatic and adipose tissue fragments were excised. The tissues were homogenized immediately in extraction buffer (mM) (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 EDTA, 10 sodium vanadate, 2 PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments, Westbury, New York, USA) operated at maximum speed for 30 s. The extracts were centrifuged at 11,000 rpm and 4°C in a Beckman 70.1 Ti rotor (Palo Alto, CA, USA) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification, using the Bradford method (Bradford 1976). Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS1, IRS2 at 4°C overnight, followed by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-phosphotyrosine (PY). In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked, probed and developed, as described previously De Souza et al. (2005). Antibodies used for immunoblotting were anti-phospho-PERK, anti-phospho-eIF-2 α (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-IR, anti-IRS1, anti-IRS2, anti-Phosphotyrosine (PY), anti-phospho-JNK, anti-NF- κ B, anti-phospho-I κ B, and anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Chemiluminescent

detection was performed with horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies. Visualization of protein bands was performed by exposure of membranes to RX-films. The protein loading of immunoblots was always evaluated by two methods: before blotting, nitrocellulose membranes were stained with Coomassie blue, and after blotting membranes were reprobed with a β -actin antibody.

Statistical analysis

All numeric results are expressed as the mean $\pm$ standard error of mean (SEM) of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or spots in autoradiographs and quantified by optical densitometry (Scion Image). Statistical analysis was performed using the ANOVA test with Tukey post test. Significance level was established as $p < 0.05$. Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18.0 for Windows.

Results

Physiological and metabolic parameters

Table 2 shows comparative data for control and DIO rats, when sedentary and after training exercise. The DIO group demonstrated a significant increase in body weight, epididymal fat and fasting serum insulin; however, fasting glucose was not altered. No significant variations were found in body weight, epididymal fat and fasting glucose in DIO rats after exercise training. However, the rate constant for plasma glucose disappearance and fasting serum insulin were increased (95%) and decreased (52.8%), respectively, in the exercise training group, when compared with DIO sedentary group. In addition, the levels of insulin were reduced after exercise in DIO rats (53%) compared with DIO sedentary group. The obesity-induced high-fat diet caused a significant increase in serum TNF α levels (35.15%, $p = 0.02$), when compared with C group. On the other hand, the exercise-trained DIO group showed a

Table 2 Physiological and metabolic parameters

Groups ($n = 8$)	Body weight (g)	Epididymal fat (g)	Plasma glucose (mg dL ⁻¹)	Insulin (ng mL ⁻¹)	K_{ITT} (% min ⁻¹)	TNF α (p g mL ⁻¹)
C	407.8 $\pm$ 25.1	5.18 $\pm$ 0.65	78.5 $\pm$ 5.3	2.46 $\pm$ 0.4	4.65 $\pm$ 0.21	48.3 $\pm$ 5.91
C + ET	399.2 $\pm$ 19.8	4.91 $\pm$ 0.79	84.4 $\pm$ 4.2	2.31 $\pm$ 0.6	4.98 $\pm$ 0.17	45.7 $\pm$ 3.94
DIO	500.5 $\pm$ 37.5*	13.06 $\pm$ 1.4*	92.7 $\pm$ 5.8	6.95 $\pm$ 0.79*	2.3 $\pm$ 0.2*	74.5 $\pm$ 6.68*
DIO + ET	467.6 $\pm$ 31.9*	9.81 $\pm$ 1.2*	91.4 $\pm$ 6.5	3.28 $\pm$ 1.5 [#]	4.16 $\pm$ 0.3 [#]	58.2 $\pm$ 5.02 [#]

* $p < 0.05$, DIO + ET and DIO sedentary rat versus C and C + ET

[#] $p < 0.05$, DIO + ET versus DIO sedentary

reduction of 21.9% in TNF α levels ($p = 0.04$), when compared with sedentary DIO.

Effects exercise training on JNK and I κ B α phosphorylation and NF- κ B expression

An increase in JNK phosphorylation in the adipose (53%) and hepatic (120%) tissue was observed in DIO rats, when compared with control rats (Fig. 1a, d). In the DIO trained group, JNK phosphorylation decreased in both adipose (48%) and hepatic (40%) tissue, when compared with DIO sedentary (Fig. 1a, d). No difference was observed in JNK protein level in either the adipose or the hepatic tissue.

Subsequently, we examined the IKK/NF- κ B pathway in the liver and adipose tissues of lean and obese rats after the exercise protocol. In the DIO group, we observed an increase in I κ B α phosphorylation in the adipose (75%) and hepatic (100%) tissues, when compared with control rats (Fig. 1b, e, respectively). In the adipose tissue of DIO + ET rats, I κ B α phosphorylation decreased by 65% (Fig. 1b), while a 48% decrease was observed in hepatic tissue (Fig. 1e), when compared to DIO sedentary. The high-fat diet-increased NF- κ B expression in adipose (104%) and hepatic (107%) tissues, when compared with the control (Fig. 1c, f, respectively). On the other hand, exercise training in the DIO group decreased NF- κ B expression in adipose (40%) and hepatic (41%) tissues, when compared with DIO sedentary (Fig. 1c, f, respectively). No difference was observed in I κ B protein level in either the adipose or hepatic tissue.

Exercise training reduces phospho PERK and phospho eIF2 α

We determined the phosphorylation status of PERK (Thr980) and eIF2 α (Ser51) in adipose and hepatic tissues. The DIO group demonstrated increases of 80% and 135% in PERK phosphorylation, when compared to the C group (Fig. 2a, c adipose and hepatic tissues, respectively). In the DIO group, exercise training reduced PERK phosphorylation by 58 and 47% (Fig. 2a, c adipose and hepatic tissues, respectively). No difference was observed in PERK expression in either the adipose or hepatic tissue.

The DIO sedentary rats demonstrated increases of 98 and 138% in eIF2 α phosphorylation, when compared with the control group (Fig. 2b, d adipose and hepatic tissues, respectively). Exercise training in DIO rats reduced eIF2 α phosphorylation by 64 and 58% (Fig. 2b, d adipose and hepatic tissues, respectively). No difference was observed in eIF2 α expression in either the adipose or hepatic tissue. In all experiments, β -actin was used as a loading protein (data not shown).

Improve insulin signaling by exercise training

In adipose tissue, insulin induced increases in IR tyrosine phosphorylation in both the C and C + ET groups, when compared with basal (B)/saline injection group (Fig. 3a). Similar results were observed in the hepatic tissue (Fig. 3d). In the DIO group, IR phosphorylation was reduced by 105% in the adipose and 98% in the hepatic tissues, respectively, when compared with the respective C⁺ group (Fig. 3a, d). In the adipose and hepatic tissues of DIO + ET, IR phosphorylation increased by 72 and 70%, respectively, when compared to the respective DIO sedentary group (Fig. 3a, d). There were no differences in basal levels of IR tyrosine phosphorylation between the groups (data not shown), and IR protein levels did not differ between the groups (Fig. 3a, d lower panels).

IRS1 phosphorylation in the adipose tissue and IRS2 phosphorylation in the hepatic tissue increased after insulin injection in both C and C + ET groups, when compared with group B (Fig. 3b, e, respectively). In the DIO group, IRS1 tyrosine phosphorylation was reduced by 56% in adipose tissue and IRS2 was reduced by 60% in hepatic tissue, when compared with the respective control group (Fig. 3b, e). In the adipose tissue of DIO + ET, IRS1 phosphorylation increased by 57%, while IRS2 phosphorylation increased by 60% in the hepatic tissue, as compared with DIO groups (Fig. 3b, e). There was no difference in the basal levels of IRS1 and IRS2 tyrosine phosphorylation between the groups (data not shown). The IRS1 and IRS2 protein levels did not differ between the groups (Fig. 3b, e lower panels).

Insulin induced increases in Akt serine phosphorylation in both the C and C + ET groups, when compared with group B (Fig. 3c). Similar results were observed in hepatic tissue (Fig. 3f). In the DIO group, Akt phosphorylation was reduced by 61% in the adipose and 50% in the hepatic tissues, when compared with the respective control group (Fig. 3c, f). In the adipose and hepatic tissues of DIO + ET, Akt phosphorylation increased by 44 and 59%, respectively, in comparison with the DIO group (Fig. 3c, f). There was no difference in basal levels of IR tyrosine phosphorylation between the groups (data not shown). The Akt protein levels did not differ between the groups (Fig. 3c, f lower panels).

Discussion

The reports indicate that ER stress, induced by obesity, is associated with inflammation and established a link between inflammatory responses, particularly through the JNK and IKK signaling pathways (Hu et al. 2006; Hotamisligil 2008), with abnormal insulin action (Ozcan

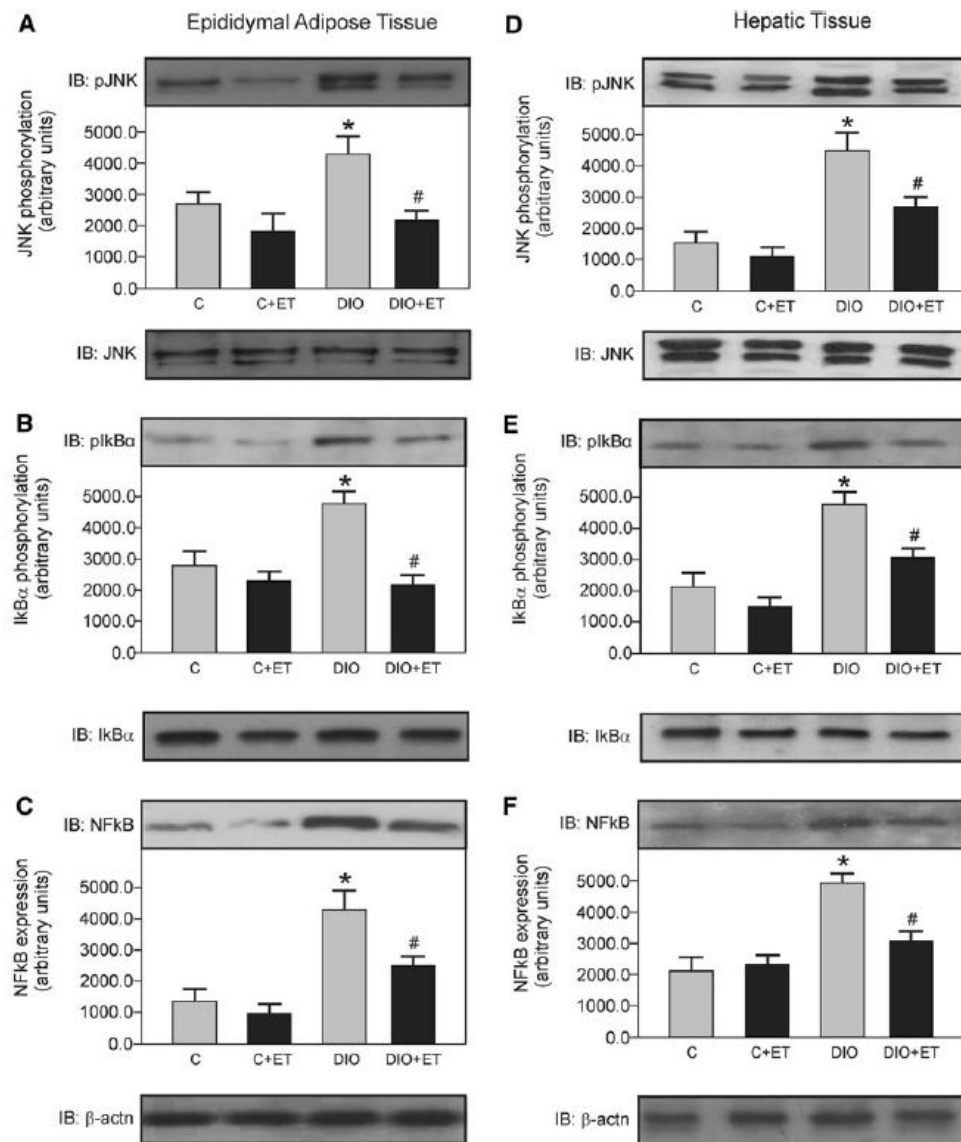


Fig. 1 Effects of training exercise on NF- κ B protein levels and JNK and I κ B α phosphorylation. Adipose and hepatic extracts from rats were prepared as described in “Materials and methods”. **a, d** Adipose and hepatic (respectively) extracts were IB with anti-phospho JNK. **b, e** adipose and hepatic (respectively) extracts were IB with anti-NF-

κ B. **c, f** Adipose and hepatic (respectively) extracts were IB with anti-phospho I κ B α . Bars represent mean $\pm$ SEM of $n = 5$ rats. * $p < 0.05$, DIO rats versus control groups; # $p < 0.05$, DIO + ET group versus DIO sedentary rats

et al. 2004; Wellen and Hotamisligil 2005). Ozcan and colleagues found that obesity is associated with the induction of chronic ER stress, predominantly in the liver and adipose tissues (Ozcan et al. 2004). The molecular mechanisms linking ER stress to glucose intolerance in trained obese animals has not been investigated yet.

Therefore, this study sought to verify whether exercise training reduces ER stress in hepatic and adipose tissues of obese animals and whether this is relational with a reduction of insulin resistance of these tissues.

In this study, we demonstrate that high-fat diet lead to an increase in JNK protein level. It is interesting to note that

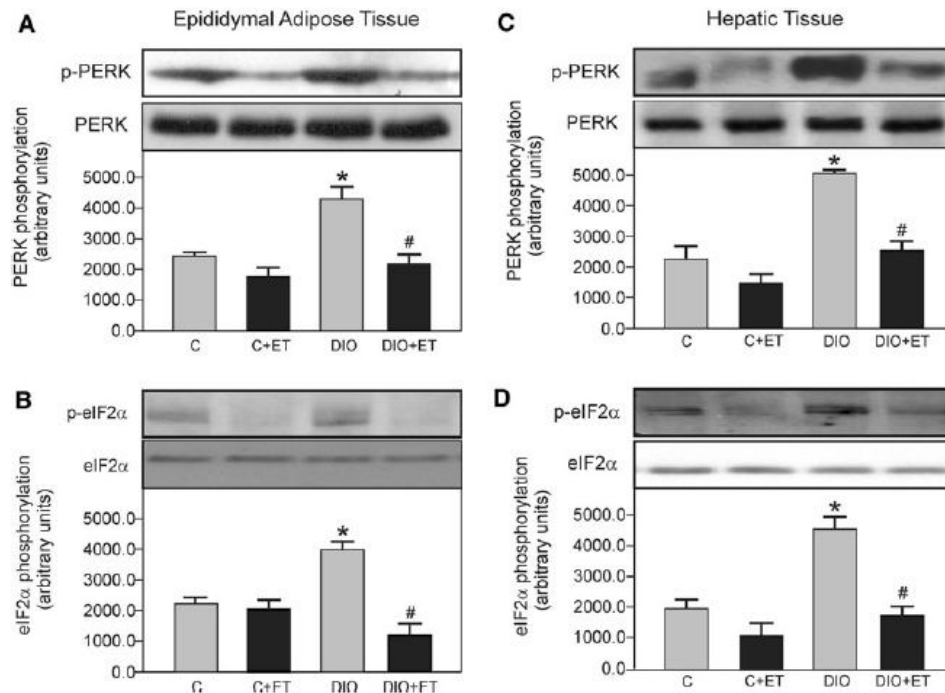


Fig. 2 Effects of exercise training on reticulum stress. Liver and adipose extracts from rats were prepared as described in “Materials and methods”. **a** Adipose tissue extracts were immunoblotted (IB) with anti-phospho PERK or anti β -actin antibodies (upper and lower panels, respectively). **b** Adipose tissue extracts were immunoblotted (IB) with anti-phospho eIF2 α or anti β -actin antibodies (upper and lower panels, respectively). **c** Liver extracts were immunoblotted (IB)

with anti-phospho PERK or anti β -actin antibody (upper and lower panels, respectively). **d** Liver extracts were immunoblotted (IB) with anti-phospho eIF2 α or anti β -actin antibodies (upper and lower panels, respectively). β -Actin was used as protein load. The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Bars represent mean $\pm$ SEM of $n = 5$ rats. * $p < 0.05$, DIO group versus sedentary control rats; # $p < 0.05$, DIO + ET versus DIO sedentary rats

chronic exercise reverses these parameters in parallel with a reduction in JNK activity and I κ B α degradation. In accordance with this, our results show increased phosphorylation of PERK and eIF2 α in animals fed with a high-fat diet. However, the activity of these proteins was observed to drop in animals submitted to exercise training. This decrease was accompanied by increased insulin sensitivity and correlates with the increase in phosphorylation of IR, IRS1 and IRS2 and serine phosphorylation Akt in liver and adipose tissues. More importantly, the changes occur in the absence of changes in adiposity or body weight.

Several mechanisms may be involved in the pathogenesis of insulin resistance in peripheral tissues. Nevertheless, it is well known that some of the molecular mechanisms leading to insulin resistance involve alterations in key molecules due to their intracellular signaling pathways, such as JNK and NF- κ B (Aguirre et al. 2000; Hirosumi et al. 2002; Lee et al. 2003). Moreover, current evidence has demonstrated that one of the pathological

mechanisms of insulin resistance is derived from impairment of endoplasmic reticulum function, a process known as ER stress.

JNK has been linked to the regulation of insulin signaling by several studies (Aguirre et al. 2000; Hirosumi et al. 2002; Lee et al. 2003; Gao et al. 2002; Cai et al. 2004; Ragheb et al. 2008). In addition, recent works linked JNK activation, ER stress and insulin resistance (Ozcan et al. 2004; Zhang et al. 2008). Thus, the role of exercise in JNK activation is more important, and deserves to be investigated in more detail. Several studies suggest that the activity of JNK intracellular signaling cascade is increased following prolonged running exercise (Boppart et al. 2000; Thompson et al. 2003). In contrast, JNK phosphorylation was reduced after resistance exercise in elderly men (Williamson et al. 2003). In this study, we observed that exercise training inhibited high-fat diet-induced JNK activity.

Activation of inflammatory signaling, including of the I κ B–NF- κ B pathway may also contribute to mediate ER

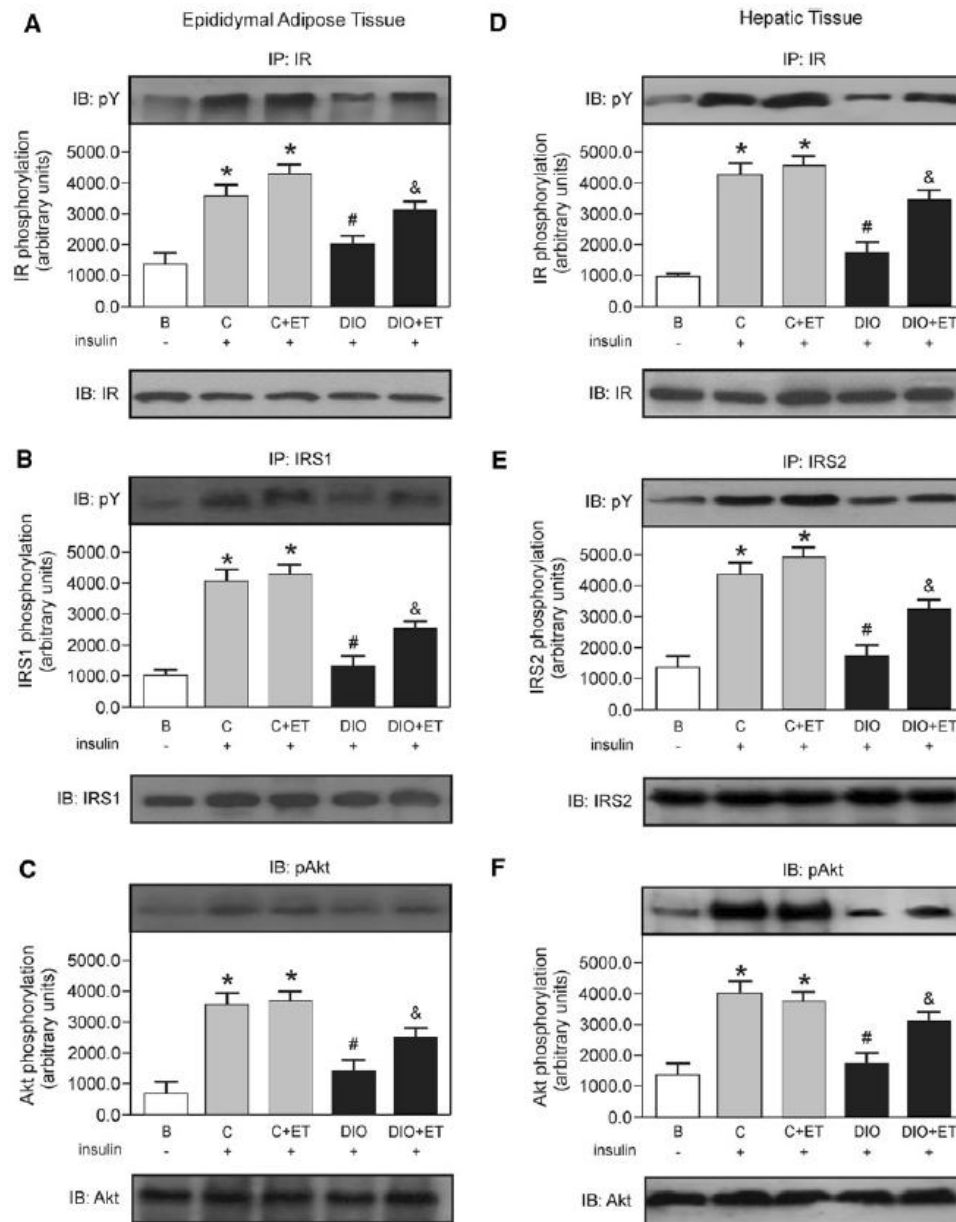


Fig. 3 Insulin signaling. Liver and adipose extracts from rats, injected with saline (B, Basal group) or insulin (+), were prepared as described in “Materials and methods”. a, d Adipose and hepatic (respectively) tissue extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-IR antibody and blotted (IB) with anti-PY antibody (upper panels) or anti-IR antibody (lower panels). b, e Adipose and hepatic (IRS1 and IRS2, respectively) tissue extracts were IP with anti-IRS1 antibody and IB with anti-PY (upper panels) and anti-IRS1 antibodies (lower panels) for adipose tissue, and IP with anti-IRS2 antibody and IB with

anti-PY (upper panels) and anti-IRS2 antibodies (lower panels) for hepatic tissue. c, f Adipose and hepatic tissue extracts were IB with anti-phospho Akt or anti-Akt antibody (upper and lower panels, respectively). The results of scanning densitometry are expressed as arbitrary units. Bars represent means $\pm$ SEM of $n = 5$ rats. * $p < 0.05$, control and control plus exercise training stimulated-insulin (+) versus Basal [no insulin control (-)]; # $p < 0.05$ DIO rats versus control sedentary rats; and & $p < 0.05$, DIO + ET group versus DIO sedentary rats

stress (Gao et al. 2002). However, a few studies have examined the effect of physical exercise on the I κ B–NF- κ B pathway. In rats, exercise activates I κ B–NF- κ B signaling in muscle (Ji et al. 2004), and acute fatiguing exercise in humans reduces NF- κ B activity. Similarly, a recent study showing that 8 weeks of aerobic exercise training reduced I κ B–NF- κ B signaling in vastus lateralis muscle from subjects with type 2 diabetes (Sriwijitkamol et al. 2006), our results show that animals submitted with a high-fat diet has pronounced reduction of I κ B α in liver and adipose tissue. This finding is an indication of IKK activation and suggests that endurance exercise training is able to reduce IKK activation and restore I κ B α expression.

Recently, it has been shown that obesity induces chronic ER stress, which, in turn, plays a central role in the development of insulin resistance and diabetes (Ozcan et al. 2004). The phosphorylation status of PERK and eIF2 α is, therefore, a key indicator of the presence of ER stress. In this study we found an increase in these indicators of ER stress in liver and adipose tissues of obese rats. Thus, we suggest that a high-fat diet-induced endoplasmic reticulum stress. In hepatic cells, ER stress inhibits the action of insulin (Ozcan et al. 2004); however, there are no reports demonstrating that exercise training decreases ER stress in liver and adipose tissues in DIO-induced obesity. In the present study, we showed that exercise training reduces phosphorylation of PERK and eIF2, indicating a decrease in ER stress and an improvement in insulin signal transduction. Although the present study does not produce direct evidence that changes in the PERK pathway are linked to changes in insulin signaling, many works in the literature have observed this outcome (Ozcan et al. 2004; Wellen and Hotamisligil 2005; Hu et al. 2006; Hotamisligil 2008).

Elegant reports indicate that ER stress, induced by obesity, is associated with inflammation and established a link between inflammatory responses, particularly through the JNK and IKK signaling pathways (Hu et al. 2006; Hotamisligil 2008), with abnormal insulin action (Ozcan et al. 2004; Wellen and Hotamisligil 2005). Thus, we suggest that exercise training reduces markers of ER stress by changing inflammatory pathways. Hu and colleagues reported that ER stress is induced in a NF- κ B-dependent manner. In addition, the inhibition of NF- κ B suppresses ER stress-induced cell death in MCF-7 cells (Hu et al. 2006). Jiang and colleagues showed that, during ER stress, phosphorylation of the α subunit of eIF2 by PERK is required for activation of NF- κ B (Jiang et al. 2003). A cause-effect relationship between inflammatory pathways and ER stress is not totally clear. In the present study, NF- κ B expression was elevated in obese rats, and reduced in trained obese rats. In addition, the activity of JNK was also increased and appears to be involved in ER stress (for review see Hotamisligil 2008). On the other hand, our data

show that the activity of JNK was largely decreased in trained obese rats. Thus, these effects may reduce ER stress.

In this context, cytokines contribute to the activation of intracellular inflammatory signal transduction. Furthermore, our group has reported that obese animals present high cytokine levels (De Souza et al. 2005; Barbuio et al. 2007; Cintra et al. 2008; Pauli et al. 2008; Prada et al. 2009; Romanatto et al. 2009). Thus, we evaluated serum TNF α concentrations. We observed increased TNF α levels in DIO rats, which may explain the modification of pro-inflammatory molecules (JNK, I κ B and NF- κ B) induced by high-fat diet (as previously demonstrated). After endurance exercise training, DIO rats demonstrated a reduction in TNF α levels.

In this sense, the liver should, therefore, be considered as a working organ during exercise and thus some of the beneficial effects of physical activity on insulin sensitivity and metabolism occur in the liver. Insulin signaling plays an important role in controlling gluconeogenic gene expression, including that of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which catalyzes the rate-limiting step of hepatic gluconeogenesis (Sutherland et al. 1996). More specifically, in the hepatic tissue this improved insulin signaling may decrease glucose production by liver. Collectively, our data provide evidence that exercise training improves insulin signaling and this mechanism involved a decrease in inflammation and ER stress in liver and adipose tissue of diet-induced obesity rats.

Unfortunately, the present study has limitations, especially, of secondary proof and isolated tissues analysis. Currently, we are unable, in our laboratory, to use 4-phenylbutyric acid (for inhibition ER stress) or tunicamycin (for induction ER stress). In addition, it is not yet clear whether exercise training improves ER stress by reducing the inflammatory pathway or by a direct action on endoplasmic reticulum stress. Although the literature shows that a reduction in ER stress results in improved insulin resistance, we could not demonstrate this in the present study, and the two events may occur in parallel. However, while this is a descriptive study, the discovery that exercise training reduces markers of ER stress may be one possible explanation, among several others, as how exercise has beneficial effects on obesity and diabetes.

Acknowledgments This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Dr Nicola Conran for English language editing.

References

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during

- association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275(12):9047–9054
- Barbui R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA (2007) Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 194:539–550
- Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M (1989) Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68:374–378
- Boppard MD, Asp S, Wojtaszewski JF, Fielding RA, Mohr T, Goodyear LJ (2000) Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle. *J Physiol* 526(Pt 3):663–669
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bray GA (2004) Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2583–2589
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE (2004) IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285–298
- Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, De Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ, Velloso LA (2008) Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 48:628–637
- De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA (2005) Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 48:1860–1871
- Frosig C, Rose AJ, Treebak JT, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF (2007) Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. *Diabetes* 56:2093–2102
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277(50):48115–48121
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333–336
- Hotamisligil GS (2008) Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* 32:S52–S54
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH (2006) Autocrine tumor necrosis factor α links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26:3071–3084
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhilber N, Vina J (2004) Acute exercise activates nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J* 18(13):1499–1506
- Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC (2003) Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ B in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol* 23:5651–5663
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF (2003) c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278(5):2896–2902
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457–461
- Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ (2008) Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* 586(2):659–671
- Prada PO, Ropelle ER, Mourão RH, De Souza CT, Pauli JR, Cintra DE, Schenka A, Rocco SA, Rittner R, Franchini KG, Vassallo J, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ (2009) EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet fed mice. *Diabetes* 58:2910–2919
- Ragheb R, Medhat AM, Shanab GM, Seoudi DM, Fantus IG (2008) Links between enhanced fatty acid flux, protein kinase C and NF- κ B activation, and apoB-lipoprotein production in the fructose-fed hamster model of insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 370:134–139
- Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degaspari GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA (2009) Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 284:36213–36222
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB (2006) Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol* 577:997–1007
- Schenk S, Horowitz JF (2007) Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1690–1698
- Scott MD, Atwater I, Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 21:470–475
- Shoelson SE, Lee J, Yuan M (2003) Inflammation and the IKK β /NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:S49–S52
- Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, Berria R, Eagan P, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Masi N (2006) Reduced skeletal muscle inhibitor of κ B β content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. *Diabetes* 55:760–767
- Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK (1996) New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1336):191–199
- Thompson HS, Maynard EB, Morales ER, Scordilis SP (2003) Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 178(1):61–72
- Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111–1119
- Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C, Trappe S (2003) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol* 547:977–987
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61–73
- Zierath JR (2002) Invited review: exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 93:773–781

4. DISCUSSÃO

A transição nutricional moderna transformou o cenário de fome em um quadro de pandemia de obesidade, que acomete milhões de pessoas, principalmente nos países ocidentais. Além dos diversos aspectos psicossociais, esta doença está relacionada ao aumento de morbidade e mortalidade em decorrência de sua freqüente associação com diversas doenças, tais como HAS, dislipidemias, ovários policístico, esteatose hepática não alcoólica, DM-2, dentre outras (Kopelman, 2000). O indivíduo obeso apresenta fenótipo complexo que inclui, em diferentes graus, hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina. Embora nem todos os mecanismos moleculares estejam completamente elucidados, é consenso que todos estes achados contribuem para a perpetuação da obesidade e das doenças a ela relacionadas (Boden, 2011).

Distúrbios na via inflamatória, mais especificamente a exacerbação dela, precedem e acompanham a progressão da RI, do DM-2 e obesidade. O círculo vicioso tem início com a ingestão elevada de gordura saturada e/ou do tecido adiposo armazenado em excesso no organismo, seguidos pelo processo inflamatório, que traz prejuízos a via de sinalização da insulina, levando a um quadro caracterizado por RI, hiperinsulinemia e, ainda, favorecimento ao depósito de gordura no organismo. Dessa forma, o acúmulo de gordura corporal pode reiniciar o ciclo. Recentemente, o estresse de retículo vem emergindo como uma ligação entre a inflamação e a RI (Hotamisligil et al., 1996; Kroder et al., 1996).

O comprometimento dos mecanismos que regulam a homeostase da glicose associa fisiopatologia da obesidade ao DM-2. Apesar dos avanços das pesquisas nessa área, o conhecimento permanece limitado. Com base nisso e com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares envolvendo estresse de retículo

endoplasmático em situação de resistência à insulina na obesidade, utilizou-se no primeiro momento do presente trabalho, o modelo animal de obesidade induzida por dieta HL. Para tanto, os animais foram expostos ao consumo *ad libitum* de dieta rica em gordura. Esta alimentação retrata o consumo da sociedade moderna. O modelo de obesidade induzida por dieta HL constitui uma situação fisiológica de aumento de citocinas inflamatórias que diminuem a fosforilação em tirosina e aumentam a fosforilação em serina de moléculas importantes da via da insulina, comprometendo os sinais de regulação da homeostase energética (De Souza et al., 2005).

Após o tratamento com a dieta hiperlipídica, foram avaliados os parâmetros metabólicos, peso corporal e da gordura epididimal e atividade molecular. Ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram significativo ganho de peso ponderal. Animais controle apresentaram média de 407, 8g ($\pm 25,1$) e os animais DIO, 500,5g ($\pm 37,5$). Além disso, ao avaliar o peso da gordura epididimal, observou-se uma drástica elevação no grupo DIO (13,06g), chegando ao aumento de 152,2% quando comparado ao grupo controle (5,18g). Mesmo após o exercício físico, animais obesos não apresentaram perda de peso. De Souza e colaboradores (2005), obtiveram resultados semelhantes quanto à evolução ponderal e o desenvolvimento da obesidade em modelo experimental similar.

O grupo DIO apresentou alterações metabólicas importantes, como o aumento significativo da insulina de jejum, mas ainda não apresentava alterações da glicose. De forma interessante, o grupo DIO apresentou insulina de jejum significativamente maior (52,8%) em comparação ao grupo DIO exercitado. Este achado demonstrou a melhora do quadro de hiperinsulinemia após exercício físico. A hiperinsulinemia constatada indica RI no grupo obeso. Para confirmar esta hipótese, foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT) que demonstrou a

diminuição na taxa de desaparecimento de glicose (k_{ITT}) no grupo DIO em comparação ao grupo controle. A interferência nos processos normais de regulação homeostase de glicose (hiperinsulinemia e RI) precede a progressão para o DM-2. No grupo DIO exercitado, a taxa de desaparecimento de glicose aumentou (95%) quando comparado ao grupo DIO, o que sugere melhora da resposta à ação deste hormônio no grupo exercitado. Coletivamente, estes resultados indicaram que a dieta HL foi eficaz em induzir resistência à insulina no grupo DIO, assim como a melhora do quadro é observada com o exercício físico.

Para melhor compreensão das alterações metabólicas ocorridas no modelo experimental, as importantes proteínas responsáveis pela transdução do sinal insulínico foram avaliadas: IR, IRS-1 e Akt no tecido adiposo; IR, IRS-2 e Akt no tecido hepático. Os resultados deste estudo foram semelhantes aos anteriores, já que em animais controle, após a injeção de insulina, observou-se o aumento da atividade das proteínas da via da insulina IR, IRS-1, IRS-2, e Akt, demonstrando a preservação da sensibilidade das células hepáticas e adiposas ao hormônio. Já, nos animais DIO, foi observada redução significativa da atividade destas mesmas moléculas, em comparação ao grupo controle, demonstrando RI. Por outro lado, no tecido adiposo e hepático de ratos DIO exercitados, a fosforilação do IR aumentou 72% e 70%, respectivamente, quando comparado ao grupo DIO sedentário. A fosforilação do IRS-1 no tecido adiposo e IRS-2 no tecido hepático aumentaram 57% e 60%, respectivamente, no grupo obeso exercitado, quando comparado ao grupo DIO. A insulina também induziu aumento da fosforilação em serina da Akt após o exercício físico em ambos tecidos. Tais resultados estão de acordo com estudos prévios (De Souza et al., 2005; Ropelle et al., 2006) que demonstraram que a dieta hiperlipídica é responsável pela resistência à ação da insulina e não a falhas na

secreção deste hormônio. E o exercício foi eficiente em melhorar o quadro de RI de acordo com diferentes parâmetros. Estudos anteriores têm apontado que o exercício físico aumenta a responsividade à insulina em tecido adiposo, músculo esquelético e fígado, e este aumento na captação de glicose envolve via IRS/PI3K/Akt (Luciano et al., 2002; Peres et al., 2005; Ropelle et al., 2006).

A prevenção e tratamento de doenças relacionadas a RI vem sendo intensamente estudadas, porém os mecanismos moleculares que associam o estresse de RE e inflamação à intolerância à glicose em animais obesos treinados ainda não haviam sido investigadas. Portanto, no segundo momento desse estudo procurou-se avaliar se o treinamento físico reduz o estresse de RE e inflamação nos tecidos hepático e adiposo de ratos obesos e se este relaciona-se com uma redução da resistência à insulina nestes tecidos.

Nutrientes, hormônios e exercício físico parecem ser importantes participantes do complexo e integrado sistema de controle da homeostasia da glicose, entretanto, não há uma causa específica para a etiologia da resistência à insulina em todos os indivíduos obesos; é provável que os mecanismos exatos diferem entre indivíduos e entre populações. Diante disso, pesquisadores de todo o mundo vêm sendo atraídos pela busca de fatores relacionados ao tecido adiposo que modulam a sensibilidade insulínica. Durante as últimas décadas, demonstrou-se fortes evidências que os sinais da insulina são negativamente afetados pela via inflamatória em diferentes tecidos. O principal mecanismo pelo qual a sinalização da insulina pode ser negativamente regulada na obesidade é, certamente, a fosforilação em resíduos de serina nas proteínas da via da insulina IR, IRS-1, IRS-2, impedindo a transdução do sinal insulínico nos tecidos alvos da insulina. Atualmente, foram

implicados nesse processo os ácidos graxos livres, assim como vários hormônios e citocinas produzidas por adipócitos (Schenk et al., 2008).

Diversos mecanismos inflamatórios podem estar envolvidos na patogênese da resistência à insulina nos tecidos periféricos. É consenso que alguns dos mecanismos moleculares envolvem alterações na ação de moléculas-chaves da via inflamatória JNK e NF- κ B (Lee et al., 2003). Consistente com estudos anteriores, o aumento das citocinas inflamatórias foi observado no grupo obeso (Shoelson, 2003; De Souza et al., 2005; Wellen e Hotamisligil, 2005). O grupo obeso apresentou aumento significativo da atividade da JNK e I κ B α , assim como da expressão da NF- κ B em comparação ao grupo controle no fígado e tecido adiposo. De forma interessante, em animais DIO treinados observou-se uma diminuição significativa do *status* inflamatório em comparação ao grupo DIO, evidenciado pela diminuição significativa da atividade da JNK e I κ B α e expressão NF- κ B nos tecidos adiposo e hepático. Além disso, observou-se o aumento do nível sérico de TNF- α em ratos DIO, sugerindo aumento da atividade inflamatória. Entretanto, em ratos DIO exercitados observou-se a diminuição significativa do nível de TNF- α .

Neste contexto, é possível que a RI descrita neste estudo seja atribuída em parte ao aumento da expressão de proteínas de resposta inflamatória, induzidas pela dieta rica em gordura. Várias evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais foram realizadas na última década e têm conectado moléculas inflamatórias às doenças metabólicas, particularmente obesidade. Utilizando uma dieta hiperlipídica semelhante à utilizada neste estudo, De Souza et al (2005) demonstraram que a dieta hiperlipídica levou a um quadro caracterizado por obesidade, resistência à insulina e aumento expressivo de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF κ B e JNK em hipotálamo de rato. Em adição,

observaram que a inibição da JNK foi capaz de reverter o quadro. A resistência à insulina relacionada à obesidade leva à redução dos efeitos antilipolíticos da insulina (Boden et al, 1994; Griffin et al., 1999).

Recentemente, foi demonstrado que a obesidade induz estresse de RE, e este, por sua vez, desempenha um papel central no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes (Ozcan et al., 2004). O estado de fosforilação da PERK e eIF2 α é, portanto, um indicador-chave da presença de estresse de RE. Até o momento, diversas pesquisas apontam a PERK como uma quinase que, no quadro de estresse de RE, sofre autofosforilação, oligomerização e ativação, promovendo a fosforilação da subunidade α do eIF2, resultando na ativação do fator de transcrição ATF4. Diante do exposto, é de claro entendimento que a PERK passou a ser alvo de estudos na obesidade e DM-2. Os resultados deste estudo demonstraram que a obesidade foi capaz de induzir o quadro de estresse de RE, verificado por meio das análises moleculares de PERK e eIF2 α que se apresentaram significativamente aumentadas no grupo DIO.

Nas células hepáticas, o estresse de RE inibe a ação da insulina (Ozcan et al., 2004); no entanto, não há relatos demonstrando que o treinamento físico diminui estresse de RE no fígado e tecido adiposo em ratos obesos por dieta hiperlipídica. Os dados do presente estudo demostram diminuição significativa da fosforilação da PERK e eIF2 α nos animais DIO treinados em comparação aos animais DIO, indicando uma diminuição do estresse de RE. A compreensão das funções da PERK e eIF2 α são fundamentais para o planejamento de novas formas de tratamento dessas doenças.

A diminuição do estresse de RE ocorreu de forma paralela a uma melhoria na transdução do sinal de insulina. Embora o estudo não comprove a ação

direta da via PERK sobre a sinalização insulínica, muitos trabalhos na literatura têm observado esse desfecho (Wellen e Hotamisligil, 2005). Demonstrou-se que o estresse de retículo, induzido pela obesidade, está associado à inflamação, por meio da sinalização da JNK e IKK (Hotamisligil et al., 2008). A exacerbação do quadro inflamatório e do estresse de RE vem sendo considerada um evento crucial nas alterações da via da insulina em obesos. Ozcan e colaboradores (2004) descreveram que a obesidade está relacionada a indução de estresse de RE crônico, predominantemente no fígado e tecido adiposo. Jiang e colaboradores (2003) mostraram que, durante o estresse de RE, a fosforilação da subunidade alfa do eIF2 por PERK é necessária para ativação do NF- κ B. Além disso, trabalhos recentes sugerem que a ativação da via inflamatória é decorrente do estresse de RE, assim como a inflamação induz o estresse de RE (Zhang et al., 2002; Ozcan et al., 2004).

Nesse sentido, o tecido hepático e o tecido adiposo devem ser considerados órgãos ativos durante o exercício e suas atividades estão relacionadas a alguns dos efeitos benéficos da atividade física sobre a sensibilidade à insulina e o metabolismo. A sinalização da insulina desempenha um papel importante no controle da expressão gênica de enzimas gliconeogênicas, incluindo a PEPCK, que catalisa a etapa limitante da gliconeogênese hepática (Sutherland et al., 1996). Mais especificamente, a sinalização da insulina no hepatócito diminui a produção de glicose pelo fígado. Coletivamente, os dados evidenciam que o treinamento físico melhora a sinalização da insulina e este mecanismo envolve a diminuição na inflamação e estresse RE nos tecidos adiposo e hepático de ratos obesos.

O presente estudo apresenta limitações, especialmente, para provas secundárias e análise de tecidos isolados. Não foi possível utilizar o ácido 4-

fenilbutírico (para inibição do estresse de RE) ou tunicamicina (para indução do estresse de RE). Além disso, ainda não está claro se o treinamento físico melhora o estresse de RE, reduzindo a via inflamatória ou por uma ação direta sobre o estresse do retículo endoplasmático. Embora a literatura demonstre que uma redução estresse de RE resulta na melhora da resistência à insulina, não conseguimos confirmar isso neste estudo, e os dois eventos podem ocorrer em paralelo. No entanto, já que este é um estudo descritivo, a descoberta de que o treinamento físico reduz os marcadores de estresse de RE é uma possível explicação, dentre várias, de como o exercício atua benéficamente na obesidade e diabetes.

Estes resultados confirmam a hipótese e demonstram que a via inflamatória e o estresse de RE ativados pela obesidade podem ser reduzidos pelo exercício físico e que isso leva a melhora na ação da insulina e pode ser uma ótima estratégia não farmacológica para reversão da resistência à insulina. Dessa forma, classificamos estresse de RE como um importante alvo terapêutico para manipulação por meio de medicamentos, nutrientes ou exercício.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a obesidade induz tanto processo de inflamação subclínica quanto estresse de RE. Apesar de não se saber o que é causa ou consequência; sabe-se que dieta rica em gordura induz ambos processos. Essas ocorrências estão relacionadas com RI. Ainda no presente estudo, demonstrou-se que o exercício físico foi eficiente em reduzir tanto processo inflamatório quanto estresse de RE. Este estudo demonstrou que a prática de exercício reduz a expressão e atividade de moléculas pró-inflamatórias (JNK, NFkB e IkB) e atividade de proteínas sinalizadoras do estresse de RE (PERK e eIF2 α) no fígado e tecido adiposo de ratos obesos por dieta hiperlipídica. O estudo demonstrou também que estas alterações foram acompanhadas do aumento da expressão de IR, IRS1 e IRS2 e aumento da atividade da Akt, diminuindo a RI. Assim, estes dados sugerem que o exercício melhora a sinalização da insulina e esta melhora está associada à diminuição da inflamação e estresse de RE.

REFERÊNCIAS

- ABEL, ED; PERONI, O; KIM, JK; KIM, Y; BOSS, O; HADRO,E; MINNEMANN, T; SHULMAN, GI; KAHN, BI. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature** 409: 729-33. 2001.
- AGUIRRE, V; UCHIDA, T; YENUSH, L; DAVIS, R; WHITE, MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **Journal of Biology Chemystri** 12: 9047-9054. 2000.
- ALESSI, DR; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Current Opinion in Genetics e Development** 8:55-62. 1998.
- AMARAL, ME; BARBUIO, R; MILANSKI, M; ROMANATTO, T; BARBOSA, HC; NADRUZ, W; BERTOLO, MB; BOSCHERO, AC; SAAD, MJ; FRANCHINI, KG; VELLOSO, LA. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. **Journal of Neurochemistry** 98: 203–212. 2006.
- ASANTE-APPIAH, E; KENNEDY, BP. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism** 284: 663-670. 2003.
- BACKER, JM; MYERS, MG; SHOELSON, SE; CHIN, DJ; SUN, XJ; MIRALPEIX, M; HU, P; MARGOLIS, B; SKOLNIK, EY; SCHLESSINGER, J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO Journal** 11: 3469-3479. 1992.

- BARBEAU, P; LITAKER, MS; WOODS, KF; LEMMON, CR; HUMPHRIES, MC; OWENS, S; GUTIN, B. Hemostatic and inflammatory markers in obese youths: effects of exercise and adiposity. **Journal of Pediatrician** 141: 415-20. 2002.
- BASTARD, JP; MAACHI, M; LAGATHU, C; KIM, MJ; CARON, M; VIDAL, H; CAPEAU, J; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network** 17:4-12, 2006.
- BERTOLOTTI, A; ZHANG, Y; HENDERSHOT, LM; HARDING, HP; RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology** 2: 326–332. 2000.
- BJORNTORP, P; DE JOUNGE, K; SJOSTROM, L; SULLIVAN, L. The effect of physical training on insulin production in obesity. **Metabolism** 19:631-638. 1970.
- BODEN, G; CHEN, X; RUIZ, J; WHITE, JV; ROSSETTI, L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **Journal Clinical Investigation** 93: 2438–2446. 1994.
- BODEN, G; DUAN, X; HOMKO, C; MOLINA, EJ; SONG, W; PEREZ, O; CHEUNG, P; MERALI, S. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals **Diabetes** 57: 2438–2444. 2008.
- BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity** 2:139-143. 2011.
- BONORA, E; MANICARDI, V; ZAVARONI, I; COSCELLI, C; BUTTURINI, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. **Diabetes and Metabolism** 2:116-21. 1987.

- BURN, JH; DALE, H. On the location of action of insulin. **Journal of Physiology** 59: 164-192. 1924.
- CALFON, M; ZENG, H; URANO, F; TILL, JH; HUBBARD, SR; HARDING, HP; CLARK, SG; RON, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature** 415: 92–96. 2002.
- CAMPBELL, PJ; MANDARINO, LJ; GERICH, JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism** 37: 15-21. 1988.
- CARTEE, GD; DEAN, DJ. Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. **American Journal Physiology** 266:946–952. 1994.
- CARVALHO, HF; RECCO-PIMENTEL, SM. **A célula**. 2. ed São Paulo: Manole, 2007. 380 p.
- CHAUVEAU, A; KAUFMANN, M. Expériences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles es respos et en travail. **Comptes Rendus Hebbomadaires des Seances de l'Academie des Sciences** 104 : 1126-1132. 1887.
- CHEN, X ; SHEN, J; PRYWES, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. **Journal of Biology Chemystri** 277:13045–13052. 2002.
- CROSS, DA; ALESSI, DR; COHEN, P; ANDJELKOVICH, M; HEMMINGS, BA. Inhibition of glycogen synthase kinase- 3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature** 378:785-789. 1995.

- CULLINAN, SB; ZHANG, D; HANNINK, M; ARVISAIS, E; KAUFMAN, RJ; DIEHL, A. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent. **Cell Survival** 23:7198-7209. 2003.
- DEMPSEY, PW; DOYLE, SE; CHENG, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Revist** 14:193-209. 2003.
- DENG, J; LU, PD; ZHANG, Y; SCHEUNER, D; KAUFMAN, RJ; SONENBERG, N; HARDING, HP; RON, D. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. **Molecular and Cellular Biology** 24: 10161–10168. 2004.
- DE SOUZA CT; ARAUJO, EP; BORDIN, S; ASHIMINE, R; ZOLLNER, RL; BOSCHERO, AC; SAAD, MJ; VELLOSO, LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology** 146: 4192–4199. 2005.
- DE SOUZA, CT; FREDERICO, MJ; DA LUZ, G; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR; VELLOSO, LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. **Journal of Physiology** 588: 2239-53. 2010.
- FALLON, KE; FALLON, SK; BOSTON, T. The acute phase response and exercise: court and field sports. **British Journal of Sports Medicine** Loughborough 35: 170- 173. 2001
- FRIEDMAN, JM. Obesity in the new millennium. **Nature** 404: 632-634. 2000.
- GOLAY, A; BOBBIONI, E. The role of dietary fat in obesity. **International Journal of Obesity** 3: 7-11. 1997.

- GOODYEAR, LJ; KAHN, BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Medicine** 49: 235-261. 1998.
- GREGOR, MF; HOTAMISLIGIL GS. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology** 29:415-445, 2011.
- GRIFFIN, ME; MARCUCCI, MJ; CKINE, GW; BELL, K; BARUCCI, N; LEE, D; GOODYEAR, LJ; KRAEGEN, EW; WHITE, MF; SHULMAN, GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activity of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes** 48: 1270–1274. 1999.
- GUPTA, S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. **Experimental Gerontology** 37: 293-299. 2002.
- HAYASHI, T; WOJTASZEWSKI, JF; GOODYEAR, LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology** 273: 1039-1051. 1997.
- HIMSWORTH, HP. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin insensitive types. **Lancet** 1:,117–121. 1936.
- HIROSUMI, J; TUNCMAN, G; CHANG, L; GORGUN, CZ; UYSAL, KT; MAEDA, K; KARIN, M. HOTAMISLIGIL, GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature** 420: 333-336. 2002.
- HOTAMISLIGIL, GS; PERALDI, P; BUDAVARI, A; ELLIS, R; WHITE, MF; SPIEGELMAN, B M; HOTAMISLIGIL, GS. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science** 271: 665–668. 1996.

HOTAMISLIGIL, GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. **International Journal of Obesity** (Lond) 32:S52-S54. 2008.

HU, P; HAN, Z; COUVILLON, AD; KAUFMAN, RJ; EXTON, JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NFkappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. **Molecular Cell Biology** 26:3071–3084. 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), 2002-2003**. 2004.

IOTF. International Association for the Study of Obesity. **The Global epidemic**. Disponível em: <http://www.ietf.org/globalepidemic.asp>. Acessado em: 10/set/2009.

IOTF. International Task Force. Disponível em: www.ietf.org, Acessado em: set/2009.

KAHN, CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism** 27: 1893-1902. 1978.

KAHN, SE. Beta cell failure: causes and consequences. **International Journal Clinical Practices Supplementation** 123: 13-18. 2001.

KELLEY, DE. Effects of weight loss on glucose homeostasis in NIDDM. **Diabetes Reviews** 3: 366–377. 1995.

KARACABEY, K. Effect of regular exercise on health and disease. **Neuroendocrinology Letters** 26: 617-623. 2005.

KINUGAWA, T; KATO, M; OGINO, K; OSAKI, S; TOMIKURA, Y; IGAWA, O. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels increase in response to

- maximal exercise in patients with chronic heart failure. **International Journal of Cardiology** 1:83-90. 2003.
- KOPELMAN, PG. Obesity as a medical problem, **Nature** 404. 2000.
- KRODER, G; BOSSENMAIER, B; KELLERER, M; CAPP, E; STOYANOV, B; MUHLHOFER, A; BERTI, L; HORIKOSHI, H; ULLRICH, A; HARING, H. Tumor necrosis factor- α - and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation** 97: 1471–1477. 1996.
- LEE, AH; SCAPA, EF; COHEN, DE; GLIMCHER, LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. **Science** 320: 1492–1496. 2008.
- LEE, YH; GIRAUD, J; DAVIS, RJ; WHITE, MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **Journal Biological Chemistry** 278: 2896-2902. 2003.
- LEWIS, CE; MCTIGUE, KM; BURKE, LE; POIRIER, P; ECKEL, RH; HOWARD, BV ALLISON, DB; KUMANYIKA, S; PI-SUNYER FX. Mortality, health outcomes, and body mass index in the overweight range: a science advisory from the American Heart Association. **Circulation** 25: 3263-3271, 2009.
- LUMENG, CN; SALTIEL, AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigations** 6:2111-2117, 2011.
- MA, Y; BREWER, JW; DIEHL, JA; HENDERSHOT, LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **Journal of Molecular Biology** 318: 1351–1365. 2002.
- MACEWAN, DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signaling** 14: 477-492. 2002.

- MATTUSCH, F; DUFAUX, B; HEINE, O; MERTENS, I; ROST, R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. **International Journal of Sports Medicine** 21: 21-24. 2000.
- MONDON, CE; DOLKAS, CB; REAVEN, GM. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. **American Journal of Physiology** 239: E169-177. 1980.
- NAKAMURA, T; FURUHASHI, M; LI, P; CAO, H; TUNCMAN, G; SONENBERG, N; GORGUN, CZ; HOTAMISLIGIL, GS. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. **Cell** 140: 338–348. 2010.
- OGDEN, Cynthia L; CARROLL, Margaret D; CURTIN, Lester R; MCDOWELL, Margaret A; TABAK, Carolyn J; FLEGAL, Katherine M. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. **JAMA** 295: 1549–1555. 2006.
- OZCAN, U; CAO, Q; YILMAZ, E; LEE, AH; IWAKOSHI, NN; OZDELEN, E; TUNCMAN, G; GORGUN, C; GLIMCHER, LH; HOTAMISLIGIL, GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science** 306: 457–461. 2004.
- PAULI, JR; ROPELLE, ER; CINTRA, DE; CARVALHO-FILHO, MA; MORAES, JC; DE SOUZA, CT; VELLOSO, LA; CARVALHEIRA, JB; SAAD, MJ. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology** 586: 659–671. 2008.
- POPKIN, BM. The nutrition transition in low-income countries — an emerging crisis. **Nutritional Reviews** 52:285–298. 1994.

PRADA, PO; ZECCHIN, HG; GASPARETTI, AL; TORSONI, MA.; UENO, M; HIRATA, AE; COREZOLA, DO; AMARAL, ME; HOER, NF; BOSCHERO, AC; SAAD, MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology** 146: 1576–1587. 2005.

PRESCOTT-CLARKE, P; PRIMATESTA, P. Health Survey for England, **HMSO**, London, 1998.

REAVEN GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annual Reviews Medicine** 44: 121–131. 1993.

ROPELLE, ER; PAULI, JR; PRADA, P; DE SOUZA, CT; PICARDI, PK; FARIA, MC; CINTRA, DE; FERNANDES, MF; FLORES, MB. VELLOSO, LA; SAAD, MJ; CARVALHEIRA, JB. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **Journal of Physiology** 577: 997–1007. 2006.

RON, D; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 8: 519–529. 2007.

SAAD, MJ; MAEDA, L; BRENELLI, SL; CARVALHO, CR; PAIVA, RS; VELLOSO, LA. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. **Diabetologia** 40: 179-186. 1997.

SAINSBURY, A; COONEY, GJ; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. **Best Practice e Research: Clinical Endocrinology e Metabolism** 16: 623-637. 2002.

SAKAKURA, Y; SHIMANO, H; SONE, H; TAKAHASHI, A; INOUE, N; TOYOSHIMA, H; SUZUKI, S; YAMADA, N; SAKAKURA, Y; SHIMANO, H; SONE H. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol

- synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 286:176-83. 2001.
- SALTIEL, AR; KAHN, CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature** 414: 799–806. 2001.
- SHEN, J; SNAPP, EL; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J; PRYWES, R. Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. **Molecular and Cellular Biology** 25: 921-932. 2005.
- SCHENK, S; HOROWITZ, JF. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigations** 117: 1690-1968. 2007.
- SCHENK, S; SABERI, M; OLEFSKY, JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation** 118: 2992-3002. 2008.
- SHOELSON, SE; LEE, J. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **International Journal of Obesity** 27:49-52. 2003.
- SIDRAUSKI, C; WALTER, P. The transmembrane kinase Ire1p is a itespecific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. **Cell** 90: 1031–1039. 1997.
- STEIN, CJ; COLDITZ, GA. The epidemic of obesity. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism** 89: 2522–2525. 2004.
- STERN, SE; WILLIAMS, K; FERRANNINI, E; DEFRONZO, RA; BOGARDUS, C; STERN, MP. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes** 54:333-339. 2005.

- SUTHERLAND, C; O'BRIEN, RM; GRANNER, DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 1336: 191–199. 1996.
- SUDI, KM; GALLISTL, S; BORKENSTEIN, MH; PAYERL, D; AIGNER, R; MÖLLER, R. Effects of weight loss on leptin, sex hormones, and measures of adiposity in obese children. **Endocrine** 14: 429-435. 2001.
- SUTHERLAND, C; OBRIEN, RM; GRANNER, DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 351: 191-199. 1996.
- TERAN-GARCIA, M; RANKINEN, T; KOZA, RA; RAO, DC; BOUCHARD, C. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** 288: E1168-1178. 2005.
- THIRONE, AC; CARVALHEIRA, JB; HIRATA, AE; VELLOSO, L.A.; SAAD, MJ. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology** 145: 281-93. 2004.
- TUNCMAN, G; HIROSUMI, J; SOLINAS, G; CHANG, L; KARIN, M; HOTAMISLIGIL, G.S. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proceedings of National Academy of Science of United State of America** 103: 10741– 10746. 2006.
- URANO, F; WANG, X; BERTOLOTTI, A; ZHANG, Y; CHUNG, P; HARDING, HP; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science** 287: 664–666. 2000.
- Wellen KE & Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation** 5: 1111-1119. 2005.

WHO. World Health Organization Expert Committee. **Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry**, Geneva: WHO Technical Reports, n.854, 1995.

WU, Z; JIAO, P; HUANG, X; FENG, B; FENG, Y; YANG, S; HWANG, P; DU, J; NIE, Y; XIAO, G; XU, H. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. **Journal of Clinical Investigation** 102: 3901-3911. 2010.

WU, J; RUAS, JL; ESTALL, JL; RASBACH, KA; CHOI, JH; YE L; BOSTRÖM, P; TYRA, HM; CRAWFORD, RW; CAMPBELL, KP; RUTKOWSKI, DT; KAUFMAN, RJ; SPIEGELMAN, BM. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 α complex. **Cell Metabolism** 2: 160-169. 2011.

YOUNGREN, JF. Regulation of insulin receptor function. **Cellular and Molecular Life Sciences** 64: 873 – 891. 2007.

ZECCHIN, HG; CARVALHEIRA, JB; SAAD, MA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** 4: 574-589. 2004.

ZHANG, P; MCGRATH, B, LI, S; FRANK, A; ZAMBITO, F; REINERT, J; GANNON, M; MA, K; MCNAUGHTON, K; CAVENER, DR. The PERK eukaryotic initiation factor 2 α kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. **Molecular Cell Biology** 22: 3864–3874. 2002.

ZIERATH, JR; WALLBERG-HENRIKSSON, H. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. **Academic Sciences** 967: 120–134. 2002.

ZINKER, BA; MOHR, T; KELLY, P; NAMDARAN, K.; BRACY, D.P. WASSERMAN, D.H. Exercise-induced fall in insulin: mechanism of action at the liver and effects on muscle glucose metabolism. **American Journal of Physiology** 266: E683-E689. 2004.