

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EXPRESSÃO DA MIOSTATINA E ACTRIIB EM RATOS SUBMETIDOS A**  
**DIETA HIPERLIPÍDICA E EXERCÍCIO**

**Patrícia de Godoy Bueno**

**São Carlos – SP**

**2009**

**EXPRESSÃO DA MIOSTATINA E ACTRIIB EM RATOS SUBMETIDOS A  
DIETA HIPERLIPÍDICA E EXERCÍCIO**

**Patrícia de Godoy Bueno**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas do Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde da Universidade  
Federal de São Carlos como requisito  
parcial para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Fisiológicas

**São Carlos – SP**

**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B928em

Bueno, Patrícia de Godoy.

Expressão da Miostatina e ActRIIB em ratos submetidos a dieta hiperlipídica e exercício / Patrícia de Godoy Bueno. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

62 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia. 2. Resistência à insulina. 3. Obesidade. 4. Exercícios aeróbicos. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

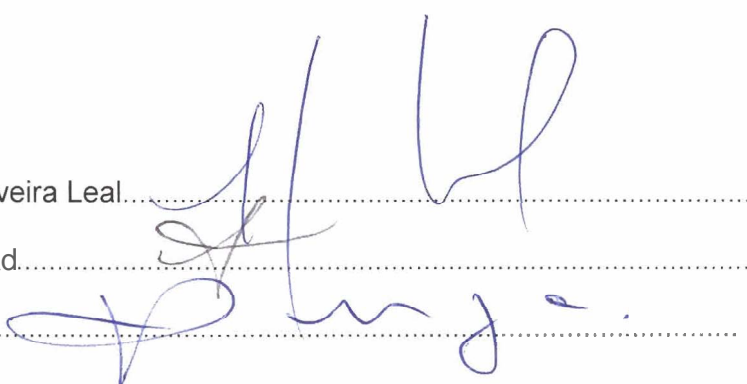
Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Patricia de Godoy Bueno

Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal.....

Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad.....

Profa. Dra. Rozangela Verlengia.....

Handwritten signatures in blue ink over dotted lines. The signatures are written in a cursive style. The first signature is for Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal, the second for Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad, and the third for Profa. Dra. Rozangela Verlengia.

## **Dedicatória**

**Aos meus familiares, meus queridos pais que sempre me apoiaram e estão todos os dias ao meu lado.....**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais,  
Maria e Aparecido por tudo que fazem por mim...

À minha orientadora,  
Ângela Leal que teve uma participação muito grande na minha formação.

Ao meu irmão Auberty,

Aos familiares,  
Isabel, Luciana, Luzia, Juliana, Marcelo, Laura, Ana Paula.

À Profa Dra. Heloísa Araújo, amiga, parceira e ótima profissional.

À Marcela Sene-Fiorese e Fernanda Duarte e ao laboratório de nutrição que muito me ensinaram.

Aos Prof Sérgio Perez e Vilmar Baldissera que me direcionaram para a pós-graduação

Ao Cacau (técnico do laboratório de fisiologia do exercício),

Ao laboratório de Neuroendocrinologia, Foguinho, Charles, Fábio, Zezinho, Ju, Profa Dra. Keiko Nonaka e técnico Sérgio

Aos colegas que me ajudaram com a pesquisa: Rafaela, Daniela, Daniele, Anderson, Sabrina, Paula Bosi, Joseane

Ao laboratório de Bioquímica e às colegas de trabalho que me ajudaram na extração de RNA.

Às minhas amigas e parceiras Joseane e Márcia.

## RESUMO

Miostatina (MSTN) é um fator de crescimento expresso e secretado pelo músculo esquelético que regula negativamente a massa muscular. MSTN é também expressa no tecido adiposo em menores quantidades. Dados recentes sugerem que a MSTN regula a adipogênese e o metabolismo energético. **Objetivo:** Verificar o efeito da dieta hiperlipídica e exercício na expressão da MSTN e de seu receptor (ActRIIB) no músculo esquelético e tecido adiposo na obesidade dietética e resistência insulínica. **Métodos:** Ratos *Wistar* adultos realizaram testes de tolerância à glicose (TTG) e tolerância à insulina (TTI) antes e após 3, 4, 8 e 12 semanas sob alimentação com dieta padrão (Grupo Controle, GC) ou dieta hiperlipídica (Grupo dieta hiperlipídica, GH). Após 12 semanas, os ratos dos GC e GH foram, aleatoriamente, separados nos grupos Controle Exercício (GCE), Dieta Hiperlipídica Exercício (GHE), Controle Sedentário (GCS) e Dieta Hiperlipídica Sedentário (GHS). GCE e GHE nadaram em tanques individuais (50 x 30cm) a 34°C, por 45 minutos, às 9h e 17h, 5 dias semana, durante 4 semanas. Após esse período, os ratos foram submetidos à TTG e sacrificados por decapitação. Músculo Gastrocnêmio e tecido adiposo foram dissecados, pesados, imediatamente congelados e estocados a -80°C. O RNAm da MSTN e ActRIIB foi quantificado por RT-PCR. Resultados: GH desenvolveu resistência insulínica de acordo com TTG e TTI. O treinamento aumentou a sensibilidade à insulina no GHE. No GHS, a expressão de MSTN foi significativamente maior na gordura mesentérica e menor na gordura epididimal e tecido adiposo marrom (TAM) comparado ao GCS. A expressão de ActRIIB diminuiu significativamente na gordura epididimal e TAM do GHS comparada ao GCS. O treinamento resultou em redução significativa da expressão de MSTN no músculo e gordura mesentérica e aumento no TAM do GCE comparado ao GCS. A expressão de ActRIIB diminuiu significativamente na gordura mesentérica e TAM no GCE comparado ao GCS. A expressão de MSTN diminuiu na gordura mesentérica e aumentou na gordura epididimal e TAM no GHE comparada ao GHS. A expressão de ActRIIB diminuiu no músculo e gordura mesentérica e aumentou no TAM no GHE comparado ao GHS. **Conclusão:** Esses dados sugerem que a expressão de MSTN e ActRIIB no tecido adiposo pode estar envolvida na resposta metabólica de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e exercício.

Palavras Chaves: resistência à insulina, obesidade, miostatina e ActRIIB.

Apoio Financeiro: FAPESP e CPNq

## Abstract

Myostatin (MSTN) is a secreted growth factor expressed in skeletal muscle and negatively regulates skeletal muscle mass. MSTN is also expressed in adipose tissue. Recent data suggest that MSTN regulates adipogenesis and energy metabolism. **Aims:** The objective of this study was to determine the influence of exercise in the expression of myostatin (MSTN) and its receptor in fat and muscle in obese and insulin resistant rats. **Methods:** Adult male *Wistar* rats were housed under controlled conditions (20-22<sup>o</sup> C, 10-14h light-dark cycle) and were allowed free access to standard rodent chow (control group, CG) or HF diet (58% Kcal from fat, high-fat group, HG) during 12 weeks. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed before and at 3, 4, 8 and 12 weeks after diet regimen. After 12 weeks, CG and HG rats were randomly assigned to a swimming training group (CGE and HGE) or a sedentary group (CGS and HGS). CGE and HE swam individually in water tanks (50x30cm) at 34<sup>o</sup> C, for 45 minutes at 0900h and 1700h, 5 day week<sup>-1</sup>, for 4 weeks. After this period, rats were submitted again to GTT and ITT and then killed by decapitation. GTT area under the curve was lower in HE compared to HGS. White gastrocnemius muscle and fat pads were dissected, weighted, immediately cooled in liquid nitrogen and stored at -70<sup>o</sup> C for subsequent analysis. The mRNA levels were quantified by real time RT-PCR. The animals were maintained according to the local University Committee guidelines for the care and use of laboratory animals. **Results:** HG developed insulin resistance according to GTT and ITT tests. Adipose fat pads (epididymal, retroperitoneal and mesenteric) were 2 to 3 times heavier in high-fat fed groups (HGS and HGE) compared to standard chow fed groups (CGS and CGE). In HGS, the expression of MSTN was significantly higher in mesenteric fat and lower in epididymal fat and Brown tissue adipose (BAT) compared to CGS rats. The expression of ActRIIB significantly decreased in epididymal fat and BAT. The training resulted in decreased of expression of expression of MSTN in muscle and mesenteric fat and increased expression in BAT of CGE compared CGS. The expression of ActRIIB increased significantly in mesenteric fat and BAT in CGE compared to CGS. The expression of MSTN decreased in mesenteric fat and increased in epididymal fat and BAT in HGE compared to HGS. The expression of ActRIIB decreased in muscle and mesenteric fat and increased in BAT in HGE compared to HGS. **Conclusions:** These data suggest that the expression of MSTN in fat tissues may be involved in the metabolic response of rats submitted to high fat diet and exercise.

Key Words: insulin resistance, obesity, MSTN and ActRIIB.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplo de um gel de agarose .....	18
Figura 2	Exemplo de Curva de MELT Original Representativa dos ciclos do PCR-RT.....	20
Figura 3	Exemplo de Curva de Amplificação Original Representativa dos ciclos do PCR-RT.....	21
Figura 4	Massa Corporal (g) durante 12 semanas de tratamento dietético.....	23
Figura 5	Ingestão alimentar (Kcal) durante 12 semanas de tratamento dietético...23	
Figura 6	Massa Corporal (g) durante 4 semanas de exercício.....	24
Figura 7	Ingestão alimentar (Kcal) durante 4 semanas de exercício.....	25
Figura 8	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) inicial (ao final do período de aclimatação) e Área sob a curva do TTG inicial.....	26
Figura 9	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da terceira semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG ao final da terceira semana .....	27
Figura 10	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da quarta semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG.....	28
Figura 11	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da oitava semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG.....	29
Figura 12	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG.....	30

Figura 13	Teste de Tolerância à Insulina (TTI) inicial e Área sob a curva do TTI inicial.....	31
Figura 14	Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da oitava semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica. Área sob a curva do TTI.....	32
Figura 15	Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica. Área sob a Curva do TTI.....	33
Figura 16	Área sob a curva do TTG pré e pós - exercício.....	34
Figura 17	Peso relativo dos tecidos, em g/100g de peso corporal.....	35
Figura 18	Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB no músculo de ratos.....	36
Figura 19	Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB na gordura mesentérica de ratos.....	37
Figura 20	Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB na gordura epididimal de ratos.....	38
Figura 21	Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB no tecido adiposo marrom de ratos.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela I	Seqüência dos primers utilizados.....	20
----------	---------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitros
MSTN	Miostatina
ActRIIB	Receptor de Activina IIb
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato Receptor de Insulina
PI-3-Kinase	quinase fosfatidilinositol 3
Akt	quinase serina/treonina
GLUT	Transportador de glicose
AGL	ácidos graxos livres
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$
IL-6	Interleucina 6

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Animais e Condições Experimentais</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Controle de Ingestão Alimentar e Massa Corporal</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Controle Glicêmico</b>	<b>14</b>
<b>3.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG)</b>	<b>14</b>
<b>3.3.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Exercício Físico</b>	<b>14</b>
<b>3.4.1 Protocolo de Exercício Físico</b>	<b>15</b>
<b>3.5 Coleta de sangue truncal e de tecidos</b>	<b>16</b>
<b>3.6 Quantificação da expressão de miostatina e ActRIIb</b>	<b>16</b>
<b>3.6.1 Extração de RNA total</b>	<b>16</b>
<b>3.6.2 Quantificação do RNA total</b>	<b>17</b>
<b>3.6.3 Determinação da integridade do RNA</b>	<b>18</b>
<b>3.6.4 Transcrição Reversa</b>	<b>18</b>
<b>3.6.5 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real</b>	<b>19</b>
<b>3.7 Análise Estatística</b>	<b>22</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Ingestão Alimentar e Massa Corporal</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1 durante as 12 semanas de tratamento dietético</b>	<b>23</b>
<b>4.1.2 durante as 4 semanas de exercício</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Controle Glicêmico</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG) (Pré – Exercício)</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI) (Pré – exercício)</b>	<b>30</b>
<b>4.2.3 Controle Glicêmico com exercício</b>	<b>33</b>
<b>4.2.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG) Pré (12</b>	
<b>semanas de tratamento dietético) e Pós – Exercício</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Peso Relativo dos Tecidos</b>	<b>35</b>

<b>4.4</b>	<b>Quantificação da Expressão do RNAm de Miostatina (MSTN) e Receptor de Activina RIIB (ActRIIB)</b>	
4.4.1	Músculo Gastrocnêmio Branco	36
4.4.2	Gordura Mesentérica	37
4.4.3	Gordura Epididimal	38
4.4.4	Tecido Adiposo Marrom (TAM)	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A prevalência de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), vem aumentando em todo o mundo e está associada a mudanças do estilo de vida como, aumento da ingestão calórica e sedentarismo. Essa é a forma mais prevalente de diabetes, presente em aproximadamente 90% dos casos da doença e está associada, basicamente, a dois mecanismos, a resistência à ação da insulina e a disfunção secretória das células  $\beta$  pancreáticas.

Dentre os fatores ambientais determinantes do DM2, destaca-se a obesidade, particularmente, o acúmulo de gordura visceral, cujo comportamento metabólico difere da gordura subcutânea. O excesso de tecido adiposo pode afetar direta ou indiretamente a sensibilidade à insulina, causando resistência à insulina que precede o DM2 (Park *et al*, 2006; Takomoto *et al*, 2008; Kadowari *et al*, 2003; Woods *et al*, 2003).

A insulina é produzida pelas células  $\beta$  pancreáticas nas Ilhotas de Langerhans, e a sua secreção é estimulada pela glicose, arginina, gliceraldeído e leucina. No músculo, tecido adiposo e fígado, a captação de glicose é regulada pela ação da insulina. Ela também promove estoque de substratos (lipogênese, glicogênese e síntese protéica), além de estimular o crescimento e diferenciação celular (Kahn *et al*, 2005).

O receptor de insulina (IR) é uma proteína tetramérica com duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , pertencentes à família das tirosinas quinases. Funcionalmente, o receptor de insulina se comporta como uma clássica enzima alostérica, em que a subunidade  $\alpha$  inibe a atividade intrínseca da tirosina quinase na subunidade  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  leva à ativação da subunidade  $\beta$  causando mudança conformacional e aumento da atividade do domínio quinase. Logo após, ocorre a fosforilação de proteínas que são substrato do receptor de insulina (IRS). Já foram identificados nove tipos de IRS, sendo IRS-3 a mais abundante no tecido adiposo e IRS-

4 no músculo esquelético, fibroblastos, fígado, coração, hipotálamo e rim. Seguinte a fosforilação das IRS, ocorre a ativação da quinase fosfatidilinositol 3 (PI-3-Kinase) que posteriormente ativa a quinase serina/treonina (Akt). A Akt desempenha um importante papel na ativação das vias metabólicas da insulina para a translocação do transportador de glicose (GLUT) para a membrana celular (Katsanos, 2004; Furukawa *et al*, 1995; Kahn *et al*, 2005).

Alguns dos efeitos metabólicos da insulina são: diminuição da produção endógena de glicose; efeitos estimulatórios na síntese de glicogênio e captação de glicose periférica, predominantemente no músculo esquelético e lipogênese do tecido adiposo. A resistência à insulina é caracterizada pela resistência a esses efeitos metabólicos que a insulina exerce (Khan *et al*, 2005; Katsano, 2004; Krook *et al*, 2004), podendo ocorrer redução da ligação da insulina ao seu receptor, redução da fosforilação do seu receptor (defeitos na atividade da tirosina quinase) e da expressão de IRS-1 e PI-3-Kinase (Ahrén *et al*, 1999; Kim *et al*, 2000; Zierath *et al*, 1997; Tremblay *et al*, 2001). No músculo esquelético, na resistência à insulina, a sinalização para a translocação de GLUT4, síntese de glicogênio e oxidação de glicose estão diminuídas. No fígado, a resistência à insulina caracteriza-se pela “inabilidade” da insulina em inibir a produção de glicose.

O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios, incluindo a leptina e adiponectina. O aumento da maioria desses fatores compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, atuando, principalmente, na sua cascata de sinalização e levando à resistência insulínica. O fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  diminui diretamente a sensibilidade à insulina e aumenta a lipólise dos adipócitos, causando resistência à insulina no músculo. A interleucina (IL)-6 aumenta a lipólise e leva à



hipertrigliceridemia e resistência à insulina em adipócitos (Kahn *et al*, 2006; Takamoto *et al*, 2008; Rosen e Spiegelman, 2006; Hotamisligil, 2006; Shoelson *et al*, 2003).

A gordura visceral, em especial, desempenha papel no acúmulo de lipídeos no fígado (Katsanos, 2004). Os depósitos de gordura visceral contribuem para o aumento AGL e citocinas pró-inflamatórias. A gordura visceral é mais sensível às ações lipolíticas das catecolaminas e menos sensível à ação antilipolítica da insulina. O aumento da lipólise na gordura visceral aumenta as concentrações de AGL que seguem pela veia portal para o fígado, causando resistência à insulina e levando ao aumento da produção hepática de glicose. Adicionalmente, indivíduos com excesso de tecido adiposo visceral apresentam concentrações elevadas de Proteína C reativa (marcador inflamatório) acompanhado de elevadas concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  e reduzidas concentrações de adiponectina (Després e Lemieux, 2006). A adiponectina tem ação protetora e o tratamento com adiponectina em ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura, aumenta a sensibilidade à insulina periférica (Shklyaev *et al*, 2003).

O acúmulo de lipídeos no músculo e fígado, principalmente de um metabólito ativo dos lipídeos, o Acil-Coa de cadeia longa, causa mudanças no metabolismo pela competição de substratos, regulação enzimática, transcrição de genes e/ou sinalização intracelular que inibe a ação da insulina e o metabolismo de glicose. A oxidação de ácidos graxos mitocondriais influencia a oxidação de glicose pela clássica via ácido graxo – glicose. O aumento intracelular de AGL resulta em competição com a glicose para a oxidação do substrato levando a inibição da atividade da piruvato desidrogenase, fosfofrutoquinase e hexoquinase II. O aumento intracelular do conteúdo dos metabólitos dos ácidos graxos como diacilglicerol, Acil-CoA (cadeia longa) e ceramida, um após o outro, ativam a cascata da quinase serina/treonina levando a fosforilação da serina/treonina dos substratos IRS-1 e 2, e causam reduzida capacidade dessas

moléculas em ativar a PI-3-Kinase, o que diminui a sinalização intracelular da insulina (Shafir *et al*, 1999; Kelley e Mandarino, 2000; Akiyama *et al*, 1996).

A exposição crônica a uma dieta rica em gordura (hiperlipídica) em ratos resulta em efeitos diabetogênicos como, aumento da adiposidade, hiperinsulinemia, leve hiperglicemia e resistência à insulina. Nesse caso, a resistência à insulina se deve a reduzida translocação do GLUT4 estimulado pela insulina para a superfície celular, que está associada a defeito da ativação da PI-3-Kinase. Além disso, foi observada também redução na atividade de Akt (quinase serina/treonina) (Rossmeisl *et al*, 2002; Zierath *et al*, 1997; Tremblay *et al*, 2001).

Em animais com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, há também oxidação de glicose prejudicada nas células  $\beta$ , devido ao aumento de ácidos graxos não esterificados que causam defeitos na translocação do GLUT2, além de menor atividade na glicoquinase (Fex *et al*, 2007) e inibição da secreção de insulina (Ahrén *et al*, 1999; Rossmeisl *et al*, 2002).

Entretanto, a maioria dos obesos e resistentes à insulina não desenvolve hiperglicemia, pois, normalmente, a célula  $\beta$  pancreática apresenta grande plasticidade e adapta-se à redução da sensibilidade à insulina, aumentando, tanto a secreção de insulina, como a massa de células  $\beta$ . Os mecanismos adaptativos das células  $\beta$  à resistência insulínica parecem envolver o aumento do metabolismo da glicose, a sinalização por ácidos graxos não-esterificados, o aumento da sinalização pela insulina/IGF-1 (*insulin growth factor*) e a ação secretagoga e mitógena da incretina GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) (Druker, 2006; Bernal-Mizrachi *et al*, 2001).

O tecido adiposo marrom (TAM) tem função distinta do tecido adiposo branco, sendo responsável pela termogênese. O TAM é rico em mitocôndrias, sendo a termogênese mediada pela expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) na membrana

mitocondrial interna, que dissipa o gradiente de prótons, que é produzido pela cadeia transportadora de elétrons. O produto final da “queima” de ácidos graxos é a produção de calor. Encontrado em mamíferos, está presente em ratos adultos e em humanos, principalmente, durante a infância. O TAM pode causar modificações na massa corporal, porque participa ativamente do controle de gasto energético, e afetar o metabolismo aumentando a sensibilidade à insulina (Yoshioka *et al*, 1992; Cinti, 2006). Entretanto, durante ativação induzida pelo frio, apenas 10% do metabolismo de TAM é derivado da captação de glicose (Virtanen *et al*, 2009).

Estudos mais recentes mostram que o TAM também está presente no humano adulto e é ativado pelo frio. Além disso, a quantidade de TAM é inversamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC), ou seja, é menor em indivíduos com sobrepeso e obesidade, especialmente em indivíduos mais velhos, sugerindo possível papel desse tecido contra a obesidade e diabetes (Cypes *et al*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al*, 2009).

No músculo esquelético, o transporte de glicose pode ser ativado por, pelo menos, duas vias separadas. Uma pela ação da insulina e outra ativada pela hipóxia e/ou contração/exercício. A captação de glicose independente de insulina envolve a proteína quinase ativada pela AMP (AMPK), que funciona como um metabólito na fosforilação de proteínas importantes em diversas vias metabólicas incluindo metabolismo de lipídeo hepático, lipólise do adipócito, oxidação de ácidos graxos no músculo e transporte de glicose (Krook *et al*, 2004; Dulloo, 2005; Kramer e Goodyear, 2007).

A sensibilidade à insulina está diretamente relacionada à quantidade de atividade física habitual. O exercício físico regular aumenta a sensibilidade à insulina em indivíduos com resistência à insulina e é prescrito para prevenção e tratamento de obesidade e DM2 (Schrauwen e Westerterp, 2002) É observado que após exercício,

ocorre aumento da expressão e/ou atividade de proteínas das vias sinalização de insulina, envolvidas no metabolismo de glicose. Assim, o aumento da captação de glicose pós-exercício está relacionado ao aumento da expressão de IRS e PI-3-Kinase, aumentando a sinalização da insulina (Hawley e Houmard, 2004). O exercício também aumenta a capacidade oxidativa do músculo resultando em aumento da oxidação de gordura em exercícios submáximos. O aumento da oxidação de gordura pode se dar pelo aumento da utilização de AGL do plasma associado ao aumento de conteúdo de proteínas que transportam ácidos graxos (Spriet e Watt, 2003; Achten *et al*, 2001; Bruce e Hawley, 2004; Lund *et al*, 1995; Sakamoto e Goodyear, 2002; Holmes e Dohn, 2004; Ivy, 2004).

Agudamente, sessões de exercício aeróbio em roedores levam ao aumento da expressão e função de várias proteínas envolvidas na sinalização intracelular da insulina. O aumento da sensibilidade à insulina no músculo após o exercício é devido a maior translocação do GLUT4 para a superfície celular. É observado também que em ratos alimentados com dieta rica em gordura, o exercício físico aeróbio agudo aumenta a via de sinalização de insulina (Oakes *et al*, 1997; Chibalin *et al*, 2000; Hansen *et al*, 1998; Pauli *et al*, 2008).

Ambos os exercícios aeróbios, em curto prazo e crônico, também aumentam a síntese de glicogênio e glicólise, atividade da hexoquinase e atividade da glicogênio sintetase. Adicionalmente, atenua o ganho de massa corporal diminuindo a adiposidade (Kim *et al*, 2000; Reynolds *et al*, 2000; Kretschmer *et al*, 2005; Estadella *et al*, 2003).

Em ratos diabéticos, o exercício também exerce efeito protetor, aumentando a sensibilidade à insulina e promovendo a manutenção das células  $\beta$  (Király *et al*, 2006; Leme *et al*, 2007).

A miostatina (MSTN) ou GDF-8 (Fator de Diferenciação e Crescimento 8) pertence a superfamília do TGF- $\beta$  (Fatores  $\beta$  de transformação e crescimento). A família dos TGF- $\beta$  é composta por mais de 35 membros peptídicos, que incluem as activinas, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e fatores de transformação do crescimento (TGFs). Esses fatores exercem ação regulatória sobre processos celulares fundamentais como crescimento e diferenciação, motilidade, adesão, reparo e morte, e desempenham, portanto papel importante sobre o desenvolvimento e a homeostase tecidual (Massagué, 1998). A MSTN assemelha-se estruturalmente às activinas e a sua cascata de sinalização é semelhante a das activinas e TGF- $\beta$  (McPherron *et al*, 1997).

A participação da activina e outros membros da família TGF- $\beta$  no metabolismo energético está sendo intensamente investigada e os dados produzidos sugerem que essas proteínas desempenham um papel até então pouco valorizado (Tsuchida, 2004; Mitchell *et al*, 2006; Mukherjee *et al*, 2007). A activina A estimula a secreção de insulina, regula o desenvolvimento pancreático e está envolvida na diferenciação e regeneração das células pancreáticas  $\beta$  (Furukawa *et al.*, 1995 a e b; Yamaoka, 1998; Li *et al.*, 2004). Camundongos deficientes na expressão de receptores de activina, tipo IIa ou IIb apresentam diversas anormalidades no pâncreas, na secreção de insulina ou intolerância à glicose (Kim *et al*, 2000). Estes estudos demonstram que a função pancreática endócrina está comprometida na presença de anormalidades dos receptores da activina. Pouco se sabe sobre o papel dessas proteínas sobre o metabolismo energético hepático. Recentemente, foi observada variação diurna da expressão das subunidades  $\beta$ A,  $\beta$ C e  $\beta$ E e sua modificação com a restrição de alimento (Rodgarkia-Dara *et al*, 2006).

Expressa essencialmente no músculo esquelético, em fibras de contração rápida (Dominique e Gérard, 2006), a MSTN é uma proteína sintetizada como uma forma precursora composta por 375 aminoácidos. Após proteólise e clivagem, formam-se a miostatina madura carboxi-terminal com 12.5-KDa e um propeptídeo N-terminal. É secretada e circula na corrente sanguínea associada a outras proteínas. Por ser um alvo terapêutico óbvio e de grande interesse comercial (Tsuchida, 2004; Matsakas e Diel, 2005), muito já se sabe sobre a miostatina, desde a sua identificação em 1997. Ela assemelha-se estruturalmente às activinas e a sua cascata de sinalização é semelhante a das activinas e TGF- $\beta$  (McPherron et al., 1997). Ela se liga efetivamente aos receptores tipo II, principalmente IIB, e tipo I, principalmente, ALK 4 e ativa as Smads 2 e 3, que são sinalizadores intracelulares (Lee *et al*, 2005). Suas ações biológicas são neutralizadas pela folistatina, pela FLRG (*follistatin-related gene family*) e por seu próprio propeptídeo (Hill *et al*, 2002).

A sequência protéica da MSTN está altamente conservada entre as espécies como no homem, roedores, galinhas, porco, peru e cachorros, sugerindo que a sua função também está conservada. O gene de MSTN foi mapeado no mesmo locus (cromossomo 2) referente a hipertrofia muscular no gado do músculo duplo (Belgian Blue). Essas espécies de gado apresentam uma mutação gênica natural e não expressam a MSTN, apresentando um exagerado crescimento muscular. Já foi observada também mutação gênica da MSTN em humanos (McPherron & Lee, 1997; Matsakas & Diel, 2005; Kollias *et al*, 2008).

O desenvolvimento de camundongos transgênicos deficientes na expressão de MSTN revelou que essa proteína funciona como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. Esses animais transgênicos apresentam aumento da massa

muscular esquelética, resultante da combinação de hipertrofia e hiperplasia celulares (McPherron *et al*, 1997).

Um dos possíveis mecanismos regulatórios da MSTN no músculo é a inibição da proliferação do mioblasto *in vitro*, fazendo com que o mioblasto permaneça na fase G1 do ciclo celular, portanto não prosseguindo para a fase S (síntese de DNA). A interrupção do crescimento muscular é devido a um aumento do p21, diminuição da Cdk2 (ciclina dependente de quinases) e da atividade da Cdk2 e diminuição do retinoblastoma (Rb), envolvidos no ciclo celular. O aumento da p21 diminui a atividade da Cdk2, que é responsável pela fosforilação do retinoblastoma. A hipofosforilação do Rb leva a célula a permanecer na fase G1 (Thomas *et al*, 2000). Além disso, a MSTN também inibe a diferenciação do mioblasto por uma via que inibe a expressão da MyoD via Smad 3 (Matsakas e Diel, 2005).

O aumento da massa muscular, em animais com MSTN nula, é atribuída a proliferação das células satélites associada a fibra muscular, que têm sido identificadas como a origem de novos tecidos musculares durante crescimento e regeneração (Kocamis e Killefer, 2002). Porém um estudo *in vitro* feito por Amthor *et al* (2009), mostrou que a hipertrofia na ausência da MSTN envolve pouco ou nenhuma célula satélite.

Os relatos sobre as ações da MSTN no tecido adiposo são ainda muito contraditórios. Ela é expressa em menores quantidades nesse tecido comparado com o músculo. Estudos *in vitro* mostram que em adipócitos maduros a MSTN causa adipogênese, porém em pré – adipócitos ela inibe a adipogênese. Já em estudos *in vivo*, a inibição da MSTN no músculo causa diminuição do tecido adiposo, porém sua superexpressão no tecido adiposo resulta em pequenos adipócitos imaturos, com maior

gasto energético e resistência à obesidade dietética e genética (Artaza *et al*, 2005, Feldman *et al*, 2006; Guo *et al*, 2009).

O receptor de MSTN tipo IIB, ActRIIB, é expresso no tecido adiposo, onde a MSTN mostrou ser capaz de atuar na via de sinalização que envolve a fosforilação das Smads. Mesmo considerando-se a baixa expressão de MSTN no tecido adiposo, como a MSTN está presente na circulação, ela pode atuar aí. Porém, um estudo feito com animais mostrou que injeções de MSTN não causaram efeitos diretos no tecido adiposo, apesar de ter ocorrido diminuição da massa muscular (Milan *et al*, 2004; Stolz *et al*, 2008).

É possível que o papel da MSTN na regulação do tecido adiposo possa apenas ser visto sob certas condições que levam ao aumento do tecido adiposo, como em casos de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica em animais não transgênicos, já que a MSTN pode influenciar a função do adipócito. Um estudo feito por Allen *et al* (2008) mostrou que a expressão da MSTN e de seu receptor está aumentada no músculo esquelético e tecido adiposo de camundongos com obesidade tanto genética quanto dietética.

Embora, não tenha sido demonstrada alteração da expressão da MSTN no músculo de modelos animais de privação de insulina (Barazzoni *et al*. 2004), a mutação do gene da MSTN em camundongos que são modelos genéticos de obesidade e diabetes (agouti  $A^y$  e Lep<sup>ob/ob</sup>) levou à supressão parcial do acúmulo de gordura e da hiperglicemia (McPherron e Lee, 2002). Em outra estratégia de suprimir a ação da MSTN, foram gerados camundongos com expressão elevada do propeptídeo da MSTN, que é capaz de inibi-la (Zhao *et al.*, 2005). Esses animais apresentaram além do aumento da massa muscular, manutenção da sensibilidade à insulina e normoglicemia quando submetidos à dieta rica em gorduras, que em animais normais levou à



resistência insulínica. Por outro lado, o aumento da produção endógena de MSTN em camundongos adultos levou ao desenvolvimento de caquexia (Zimmers et al., 2002). Ademais, há elevação da concentração sérica e muscular de MSTN em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida com perda de massa muscular (Gonzalez-Cadavit *et al*, 1998).

Esses resultados sugerem a existência de função regulatória da miostatina sobre o metabolismo energético e um possível papel benéfico da supressão da miostatina em doenças metabólicas (Gonzalez-Cadavid e Bhasin, 2004; Milan *et al*, 2004).

A expressão da MSTN, em resposta ao exercício, tem sido estudada no homem e em modelos animais. Estes estudos têm demonstrado diminuição da expressão de miostatina e de seu receptor em resposta a exercício de resistência de longa e curta duração (Matsakas e Diel, 2005; Matsakas *et al*, 2005; Heinemeier *et al*, 2007; Hulmi JJ *et al*, 2007).

Embora o papel desempenhado pela MSTN na regulação do aumento da massa muscular esteja sendo ativamente estudado, as suas implicações metabólicas no músculo não estão definidas, apesar de despertar grande interesse fisiopatológico e terapêutico. Do mesmo modo, apesar da MSTN ser expressa no tecido adiposo em menor quantidade, os resultados até agora produzidos sugerem sua ação fisiológica também aí (McPherron e Lee, 2002; Lin *et al*, 2002; Feldman *et al*, 2006).

## **2 OBJETIVO**

Verificar o efeito da dieta hiperlipídica e exercício na expressão da miostatina (MSTN) e de seu receptor (ActRIIB) no músculo esquelético e tecido adiposo na resistência insulínica promovida pela obesidade dietética.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e Condições Experimentais

Trinta ratos Wistar machos, adultos, pesando  $190 \pm 18,4\text{g}$  (média  $\pm$  erro padrão da média) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e utilizados para a realização dos experimentos. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura ( $22^{\circ}\text{C}$ ), umidade e iluminação (8-18h: claro; 18-8h: escuro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo n. 035/2007).

Todos os animais permaneceram durante uma semana em condições de aclimação com dieta padrão *ad libitum*.

Após este período, os animais foram divididos em 2 grupos:

- 1) Grupo controle (n = 15) - GC: animais alimentados com dieta padrão por 12 semanas.
- 2) Grupo dieta hiperlipídica (n = 15) – GH: animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas.

As dietas padrão e hiperlipídica possuíam a seguinte composição:

#### **Dieta Padrão:**

A dieta da marca PRIMOR (São Paulo, Brasil) contém em 100g da dieta: 23g proteína e densidade calórica de 2,57 Kcal/g, conforme informações fornecidas pelo fabricante.

#### **Dieta Hiperlipídica:**

A dieta fabricada e comercializada por Research Diets (New Brunswick, NJ), código D12492, é composta por 20% de proteína, 20% de carboidrato, 60% de lipídios e densidade calórica de 5,24 Kcal/g.

### **3.2 Controle de Ingestão Alimentar e Massa Corporal**

A ingestão alimentar e o peso corporal foram mensurados diariamente durante todo o período experimental.

### **3.3 Controle Glicêmico**

Para determinação da glicemia, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais. A glicemia foi determinada por glicosímetro portátil (Accu-Chec Active).

#### **3.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG)**

Após o período de aclimatação (TTG inicial) e ao final das semanas de tratamento 3, 4, 8 e 12 foi realizado TTG. Os animais permaneciam em jejum, no período noturno, e às 0800h do dia seguinte recebiam injeção intraperitoneal de glicose, 1,5g/Kg peso, diluído em salina (NaCl 0,9%) (Fujiwara *et al*, 2007; Stanisla *et al*, 2003). Eram coletadas amostras nos tempos 0 e 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose.

#### **3.3.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)**

Após o período de aclimatação (TTI inicial) e ao final das semanas de tratamento 8 e 12, e com intervalo de 2 dias entre os testes de TTG, foram realizados testes de TTI. Os animais permaneciam em jejum no período noturno, e às 0800h do dia seguinte recebiam injeção intraperitoneal de insulina 1U/kg peso (Fujiwara *et al*, 2007). Eram coletadas amostras nos tempos 0 e 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção de insulina.

### **3.4 Exercício Físico**

Ao final das 12 semanas, os animais dos grupos controle e sob dieta hiperlipídica foram subdivididos em dois grupos, ficando os animais distribuídos agora em 4 grupos diferentes:

- 1) Grupo Controle Sedentário (n=6) - GCS: os animais recebiam dieta padrão e mantinham-se sedentários durante 4 semanas;
- 2) Grupo Controle Exercício (n=6) - GCE: os animais recebiam dieta padrão e exercitavam-se durante 4 semanas;
- 3) Grupo Dieta Hiperlipídica Sedentário (n=6) - GHS: os animais recebiam dieta hiperlipídica e mantinham-se sedentários durante 4 semanas;
- 4) Grupo Dieta Hiperlipídica Exercício (n=6) - GHE: os animais recebiam dieta hiperlipídica e exercitavam-se durante 4 semanas.

### **3.4.1 Protocolo de Exercício Físico**

Os animais do grupo exercício foram submetidos a exercício na modalidade natação, em 2 sessões diárias de 45 minutos, às 0900 e 1700h, com frequência de 5 vezes por semana, durante 4 semanas. O exercício era realizado em tanques individuais (50 cm de altura x 30 cm de diâmetro) com água em temperatura controlada (34°C) e com sobrecarga atada à cauda para garantir que o animal não flutuasse e se mantivesse em atividade durante toda a sessão (Voltarelli *et al*, 2002). Essa sobrecarga teve um acréscimo de 1% a cada semana até atingir 5% da massa corporal, permanecendo assim até o final da quarta semana (Matsakas *et al*, 2006; Matsakas *et al*, 2005; Leme *et al*, 2007; Sene-Fiorese *et al*, 2008)

Para adaptação dos animais ao exercício, nos primeiro e segundo dias, a natação era realizada sem adição de carga na cauda, por duração de 1h (2 x 30 min), e no

terceiro dia o exercício foi realizado com duração de 90 minutos (2 x 45 min) sem adição de carga.

Durante o período de exercício, os grupos sedentários permaneciam durante 5 minutos em tanques, iguais ao do grupo exercício, com água rasa (5 cm) na mesma temperatura, simulando o estresse de exposição à água (KIRÁLY *et al*, 2007; MATSAKAS *et al*, 2005)

Ao final do protocolo de exercício foi realizado novamente, o TTG.

### **3.5 Coleta de sangue truncal e de tecidos**

No dia seguinte ao TTG pós-treinamento, os animais foram decapitados.

O sangue truncal e os tecidos adiposos brancos epididimal (EPID), retroperitoneal (RET) e mesentérico (MESENT) e o tecido adiposo marrom interescapular (TAM) e músculo gastrocnêmio branco (GASTRO) foram dissecados, pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80° C para posterior análise.

### **3.6 Quantificação da expressão de miostatina e ActRIIb**

A quantificação da expressão de miostatina e ActRIIb foi realizada pela quantificação do seu RNA mensageiro por PCR-RT. Esta análise foi realizada no laboratório de Bioquímica do DCF da UFSCar.

#### **3.6.1 Extração de RNA total**

No dia da extração, 100mg de tecido era homogenizado (*Homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*) em TRIzol<sup>®</sup> (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California*) (1ml) segundo os seguintes protocolos:

- Músculo.

Após homogenização, adicionava-se 200µL de clorofórmio e as amostras eram agitadas manualmente durante 15 segundos. A seguir as amostras permaneciam em temperatura ambiente (15 – 30° C) por 2,5 minutos. Centrifugavam-se (*Eppendorf 5804R*) as amostras por 15 minutos, a 12000rpm, a 4° C. Seguindo a centrifugação transferia-se o sobrenadante para um microtubo limpo. Eram adicionados 500µL de isopropanol e a amostra era agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a amostra era centrifugada por 10 minutos a 12000rpm (4° C) e ao sobrenadante era acrescentado 1mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500rpm (4° C), o *pellet* restante permanecia à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse tempo, acrescentava-se 30µL de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) 0,1%. As amostras eram então congeladas e armazenadas a -80° C para posterior análise.

- Tecido adiposo

Após homogenização as amostras permaneciam por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionava-se 200µL de clorofórmio às amostras e agitava-se manualmente durante 15 segundos. Logo após, as amostras permaneciam em temperatura ambiente por 15 minutos. As próximas etapas foram semelhantes àquelas descritas em relação ao músculo. Porém, após a diluição do *pellet*, as amostras eram incubadas à 60° C, em banho seco, por 15 minutos.

### 3.6.2 Quantificação do RNA total

As amostras de RNA total eram diluídas 20 vezes em água tratada com DEPC e eram feitas as leituras em espectrofotômetro (*Eppendorf*) para determinação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Era utilizada a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA (µg/µL): concentração µg/µL =  $(A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$

O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão  $A_{260}/A_{280}$ , considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0.

### 3.6.3 Determinação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização, em luz ultravioleta, do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 1)

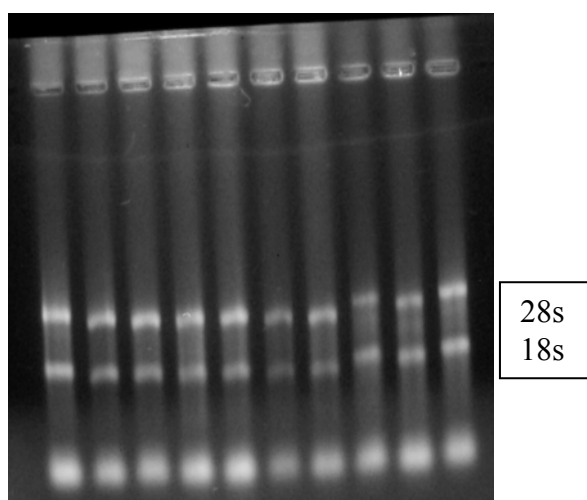


Figura 1. Exemplo de um gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo indicando a integridade do RNA totais, através da visualização das bandas ribossomais 18s e 28s.

### 3.6.4 Transcrição Reversa

Inicialmente, as amostras de RNA total eram tratadas com DNase - Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California*). Ao RNA total (1 $\mu$ g), adicionava-se solução tampão (1 $\mu$ L, 10X DNase I Reaction Buffer), enzima (1 $\mu$ L DNase I, Amp Grade) e quantidade suficiente para (QSP) 10 $\mu$ L de água tratada com DEPC. A amostra era incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, adicionava-se EDTA (1 $\mu$ L) e a amostra permanecia em banho seco a 65° C por 10 minutos.



Logo após o tratamento com DNase, adicionava-se 0,5 $\mu$ L do primer Oligo (dT) 15 (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permanecia em banho seco a 70° C por 5 minutos.

A seguir, adicionavam-se:

- 2,5 $\mu$ L de M-MLV 5x tampão de reação (*Promega Corporation, Madison, WI USA*)
- 0,625 $\mu$ L dATP 10mM
- 0,625 $\mu$ L dCTP 10mM
- 0,625 $\mu$ L dGTP 10mM
- 0,625 $\mu$ L dTTP 10mM
- 0,5 $\mu$ L M-MLV RT (transcriptase reverse)

As amostras eram então incubadas por 60 minutos a 37°C e estocadas a -20° C.

### **3.6.5 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT)**

Eram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de cDNA (40ng/ $\mu$ L), em duplicata.

- 10,5 $\mu$ L de água DEPC
- 1,25 $\mu$ L primer forward
- 1,25 $\mu$ L primer reverse
- 0,5 $\mu$ L de cDNA
- 12,5 $\mu$ L SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems Inc, Foster City, CA USA*)

As amostras eram processadas no Termociclador *Rotor- Gene, R 3000 (Robertt Research)* e os ciclos consistiam de 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94° C – 15 segundos; Tm 60 – 64° C – 30 segundos; 72° C – 60 segundos.

Os primers utilizados e suas seqüências foram os seguintes (Garma *et al.*, 2007; Debiève *et al.*, 2006) (tabela I):

Tabela I. Seqüência dos primers utilizados.

Gene	Seqüência Primers	
Miostatina	Senso	CAA ACA GCC TGA ATC CAA CTT AG
	Antisenso	CCG TGA GGG GGT AGC GAC AG
GAPDH	Senso	GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC G
	Antisenso	GTG GTG CAG GAT GCA TTG CTG A
ActRIIB	Senso	CAG GTT GGC ACC AGA CGG TAC
	Antisenso	TCG ATG GTC ACG CAG AGC TGG

As temperaturas de anelamento (Tm) dos primers foram previamente padronizadas.

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (figura 2).

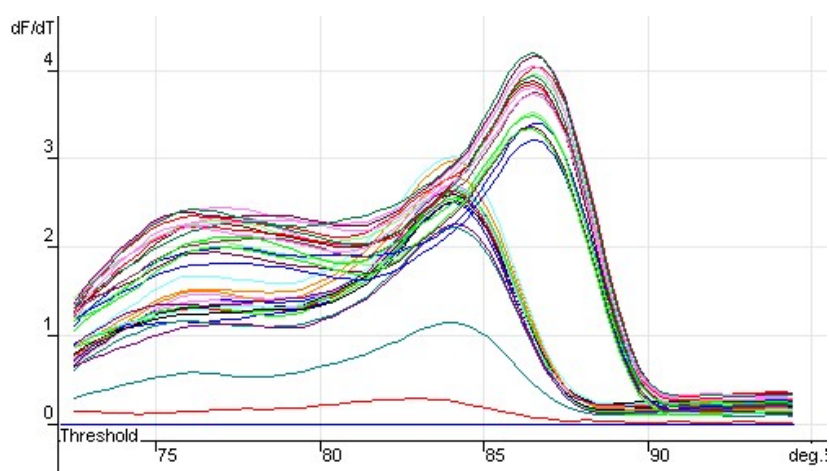


Figura 2. Exemplo de Curva de MELT Original Representativa dos ciclos do PCR-RT dos genes MSTN e GAPDH no músculo gastrocnêmio branco.

Os valores de Ct (Threshold cycle) e as curvas de melt foram fornecidos pelo *Software* Rotor Gene – 6. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (figura 3).

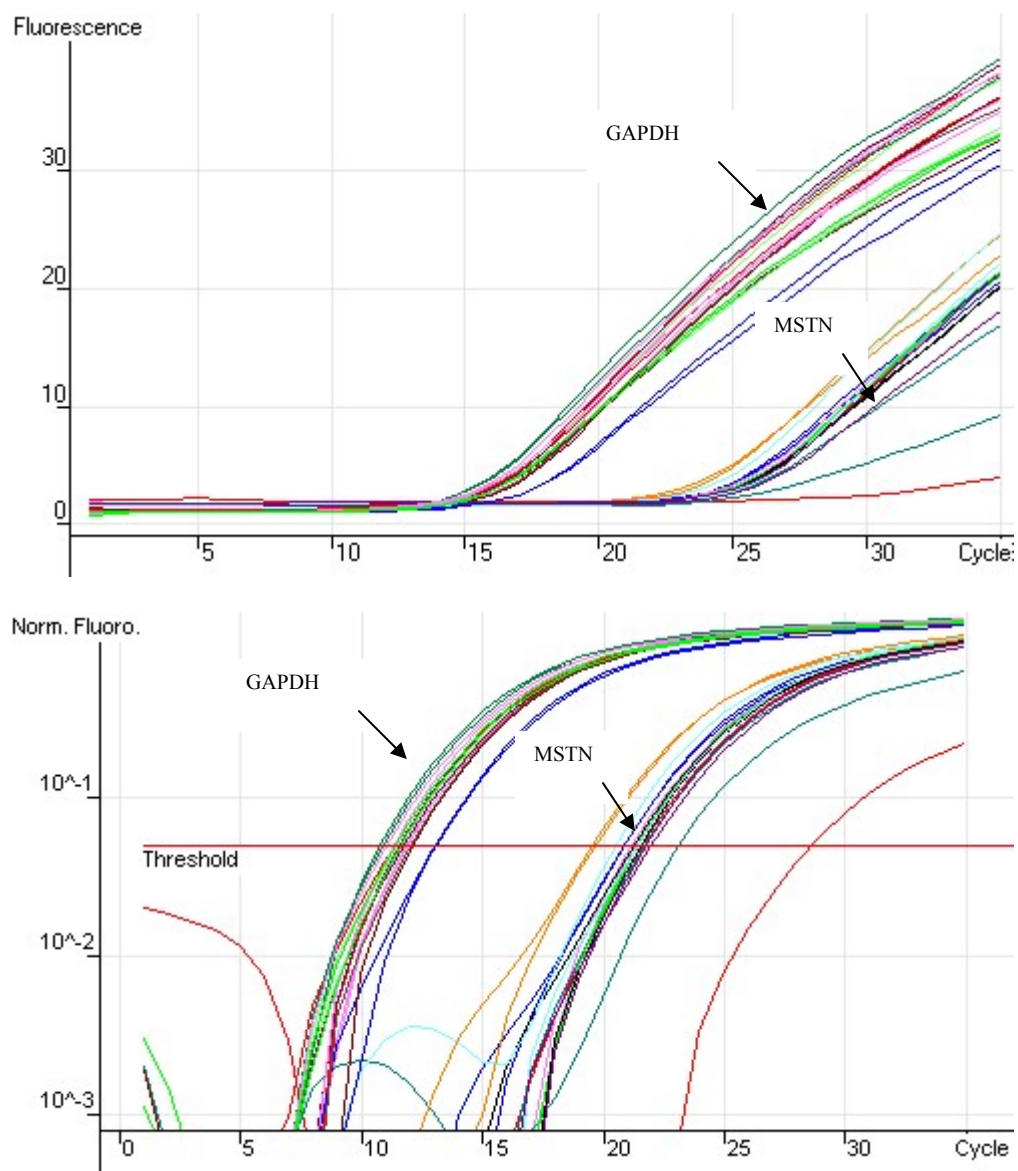


Figura 3. Exemplo de Curva de Amplificação Original Representativa dos ciclos do PCR-RT dos genes MSTN e GAPDH no músculo gastrocnêmio branco.

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de  $\Delta\Delta C_t$ . Depois de calculado a média dos  $C_t$  de cada gene (GAPDH, MSTN e ActRIIb) foi realizado:

- $\Delta C_t$  (delta  $C_t$ ) =  $C_t$  MSTN –  $C_t$  GAPDH ou  $C_t$  ActRIIB -  $C_t$  GAPDH, seguindo:
- Cálculo da média S: Média do  $\Delta C_t$ , seguindo:
- $\Delta\Delta C_T$  (delta delta  $C_T$ ):  $\Delta C_T$  - média S

Os  $\Delta\Delta C_T$  dos grupos controle sedentário, controle exercício e dieta hiperlipídica sedentário foram calculados em relação ao grupo controle sedentário e o  $\Delta\Delta C_T$  do grupo dieta hiperlipídica exercício foi calculado em relação ao grupo dieta hiperlipídica sedentário que é o controle para esse grupo. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da Miostatina foi calculado por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Com os valores em UA foram utilizados testes estatísticos.

### **3.7 Análise Estatística**

Para análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico *Minitab® 15.1.30.0*. Inicialmente, foi testada a distribuição normal dos dados. Para amostras de distribuição normais foram utilizados os testes ANOVA, Tukey para amostras não pareadas e t Student para amostras pareadas. O nível de significância estatística adotado foi de  $P < 0,05$ . Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média (EPM).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa Corporal e Ingestão Alimentar

#### 4.1.1 durante as 12 semanas de tratamento dietético (Pré – exercício)

Durante as quatro primeiras semanas, a massa corporal não foi diferente entre os grupos, porém a partir da quinta semana o grupo sob dieta hiperlipídica (GH) apresentou massa corporal significativamente maior em relação ao grupo controle (GC) ( $P < 0.05$ ) (figuras 4). A ingestão calórica do GH foi significativamente maior somente nas semanas 1 e 4 de tratamento dietético (figura 5).

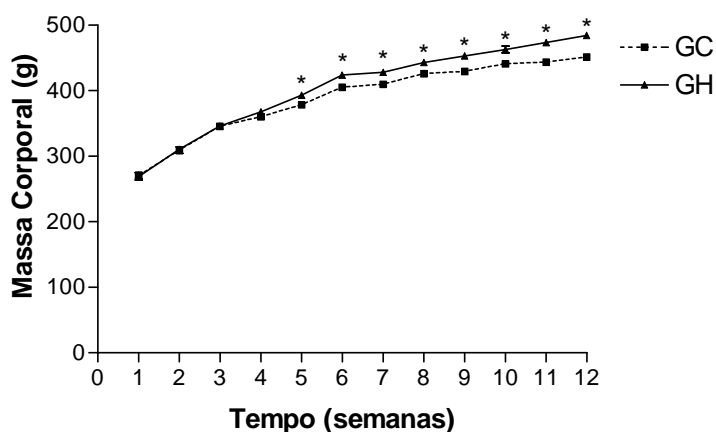


Figura 4. Massa Corporal (g). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $n = 15$  ratos/grupo. \*  $P < 0.05$ , grupo dieta hiperlipídica (GH) comparado ao grupo controle (GC).

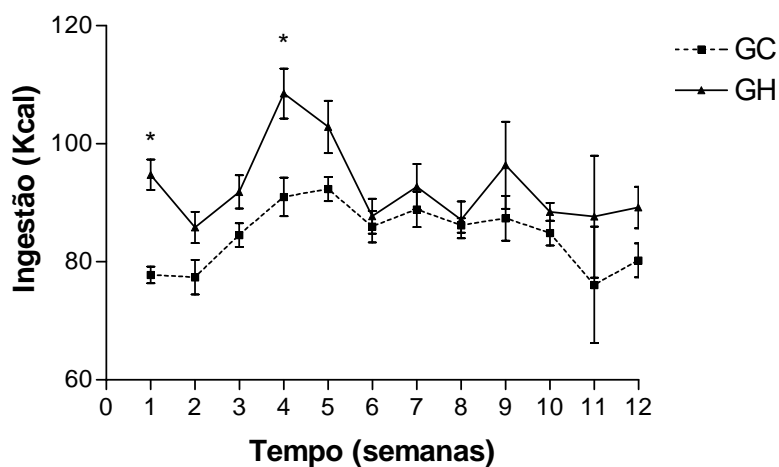


Figura 5. Ingestão alimentar (Kcal/g). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $n = 15$  ratos/grupo. \*  $P < 0.05$ , grupo dieta hiperlipídica (GH) comparado ao grupo controle (GC).

#### 4.1.2 durante as 4 semanas de exercício.

Os animais submetidos ao exercício de natação apresentaram massa corporal significativamente inferior comparado àqueles animais dos grupos sedentários, tanto do GC quanto do GH. Em relação à ingestão alimentar, apenas o grupo controle apresentou redução da ingestão calórica na primeira e quarta semanas de exercício (Figuras 6 e 7).

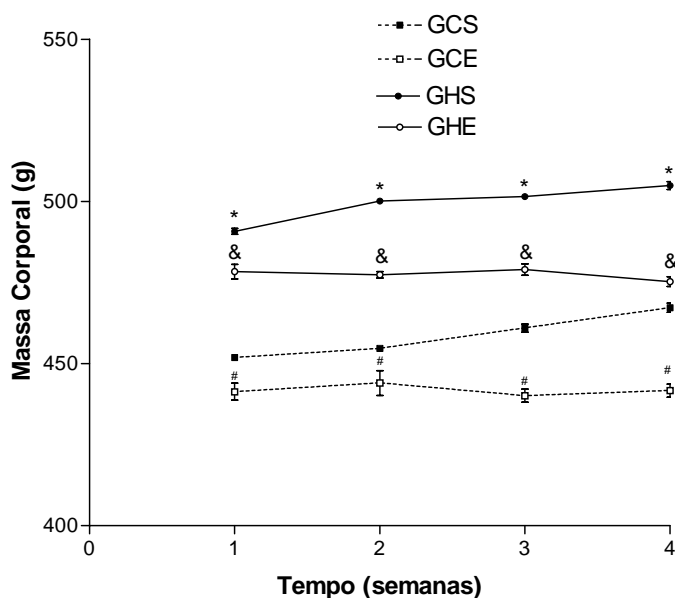


Figura 6. Massa Corporal (g). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $P < 0.05$ , GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.  $P < 0.05$ , \* GCS vs GHS; # GCS vs GCE; & GHS vs GHE

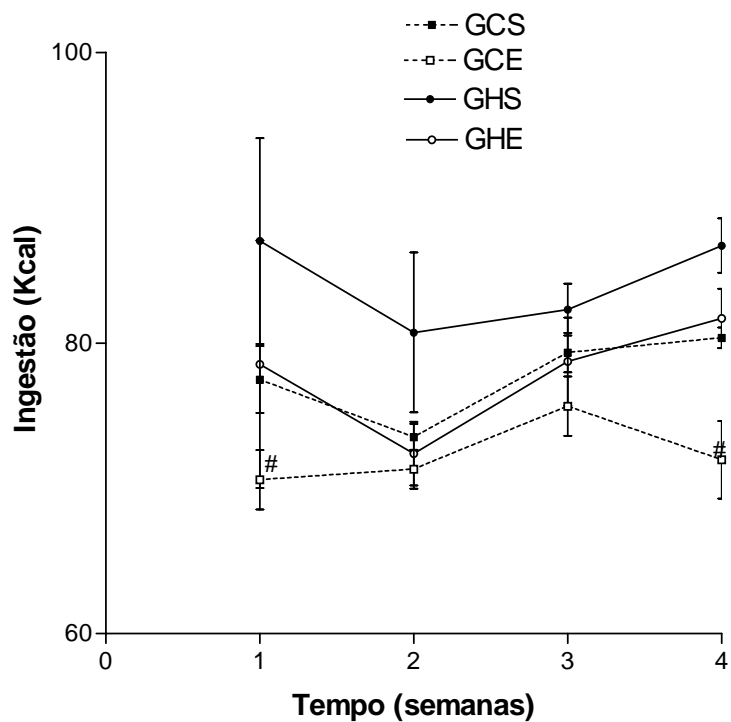


Figura 7. Ingestão alimentar (Kcal/g). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.  $P < 0.05$ , # GCS vs GCE;

## 4.2 Controle Glicêmico

### 4.2.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG) (Pré – Exercício)

No TTG inicial realizado após período de aclimação e antes do início do tratamento dietético, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose plasmática no GH quando comparado ao GC (figura 8A e B).

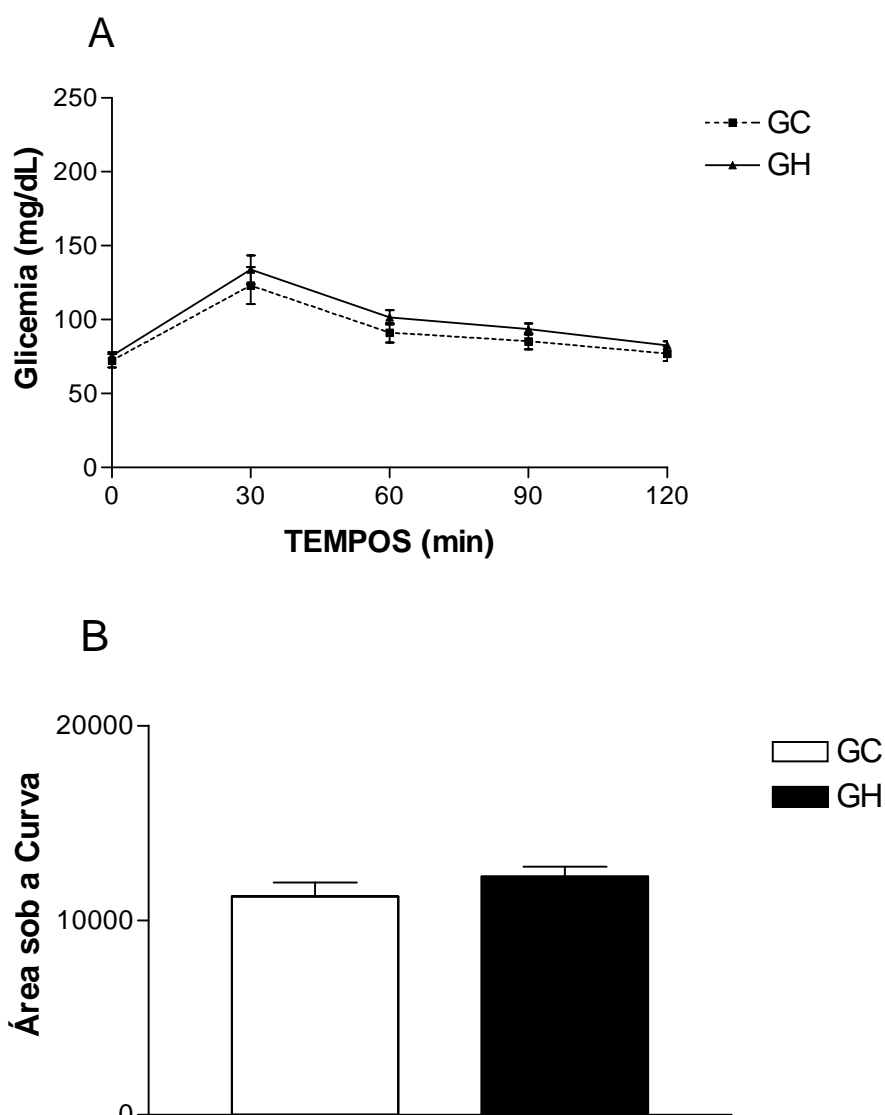


Figura 8. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) inicial (ao final do período de aclimação) e Área sob a curva do TTG inicial (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM. n= 15 ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle.



Após 3 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, o GH apresentou concentrações de glicose plasmática significativamente superiores quando comparado ao GC (figura 9A e B). O mesmo foi observado ao final da 4<sup>a</sup> (figura 10A e B), 8<sup>a</sup> (figura 11A e B) e 12<sup>a</sup> (figura 12A e B) semanas. A partir da 4<sup>a</sup> semana de tratamento com dieta hiperlipídica os animais do GH apresentaram glicemia de jejum significativamente maior em relação ao grupo controle (Figuras 10A, 11A, 12A).

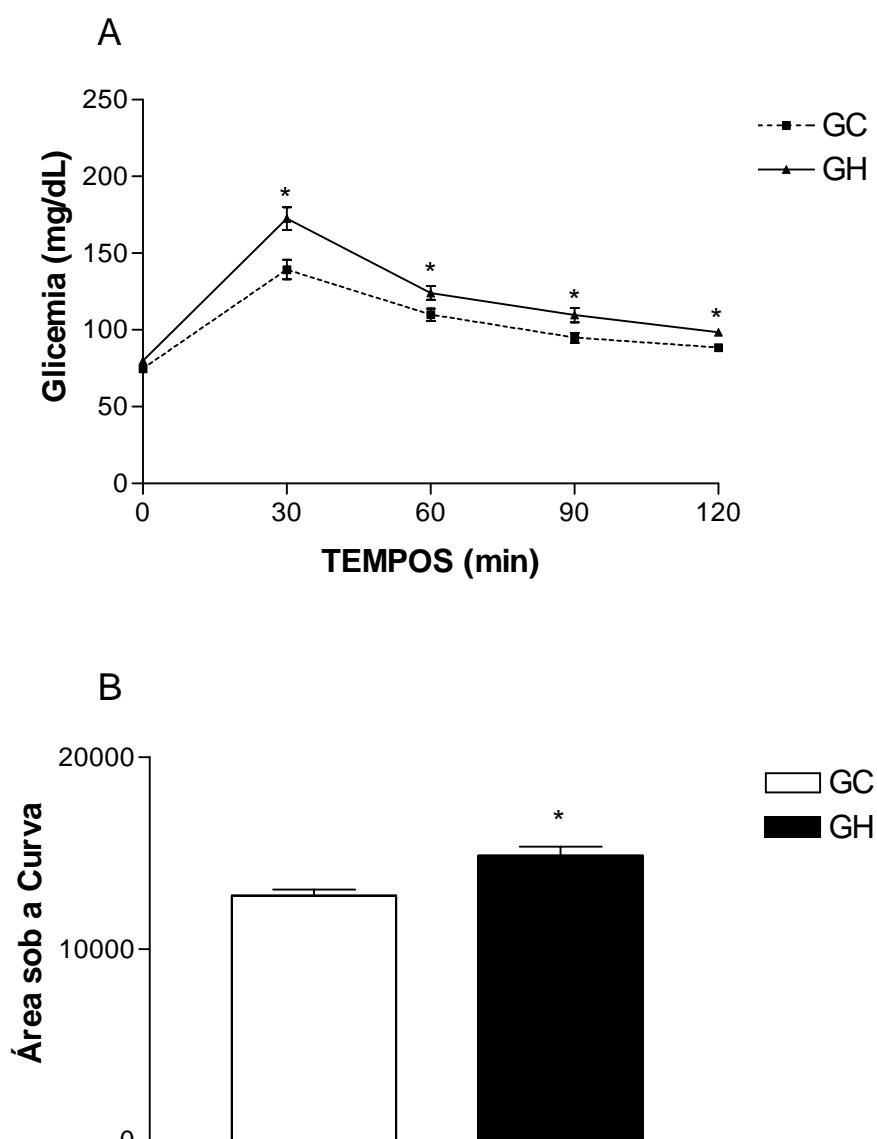


Figura 9. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da terceira semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG ao final da terceira semana (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n=15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

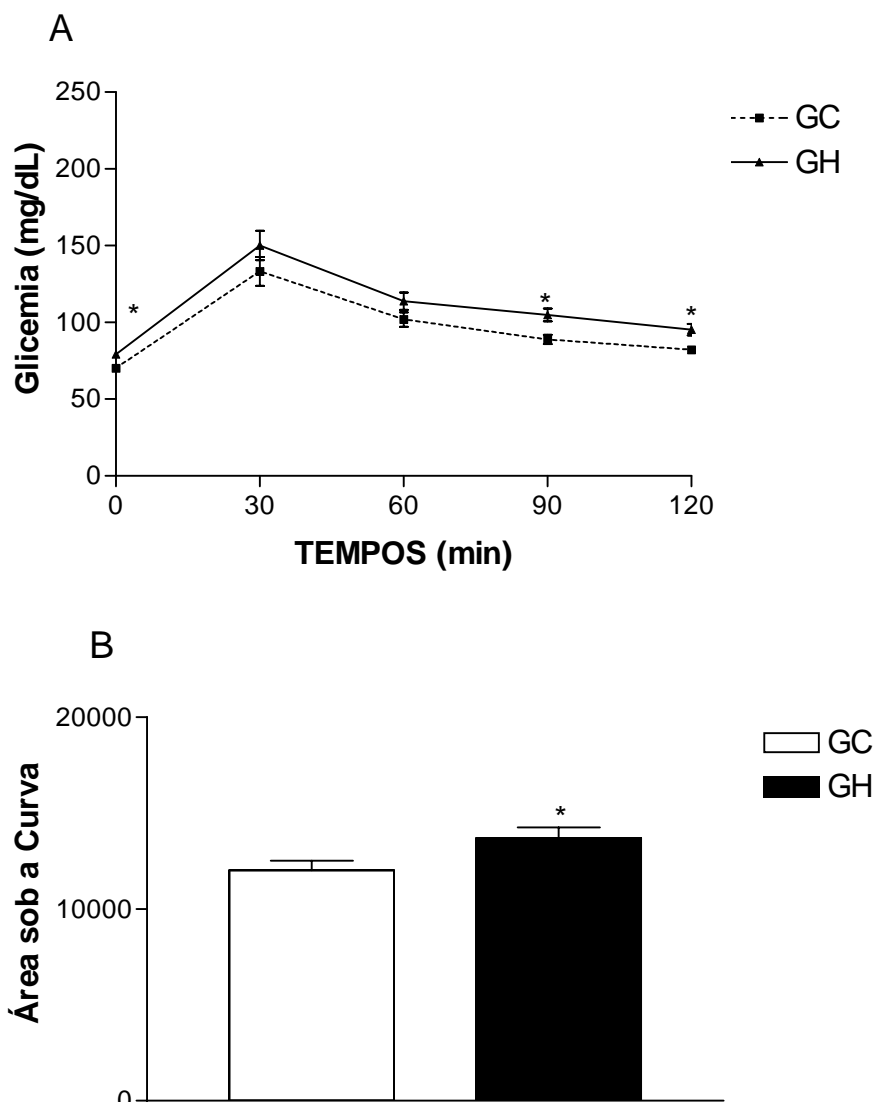


Figura 10. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da quarta semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n = 15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

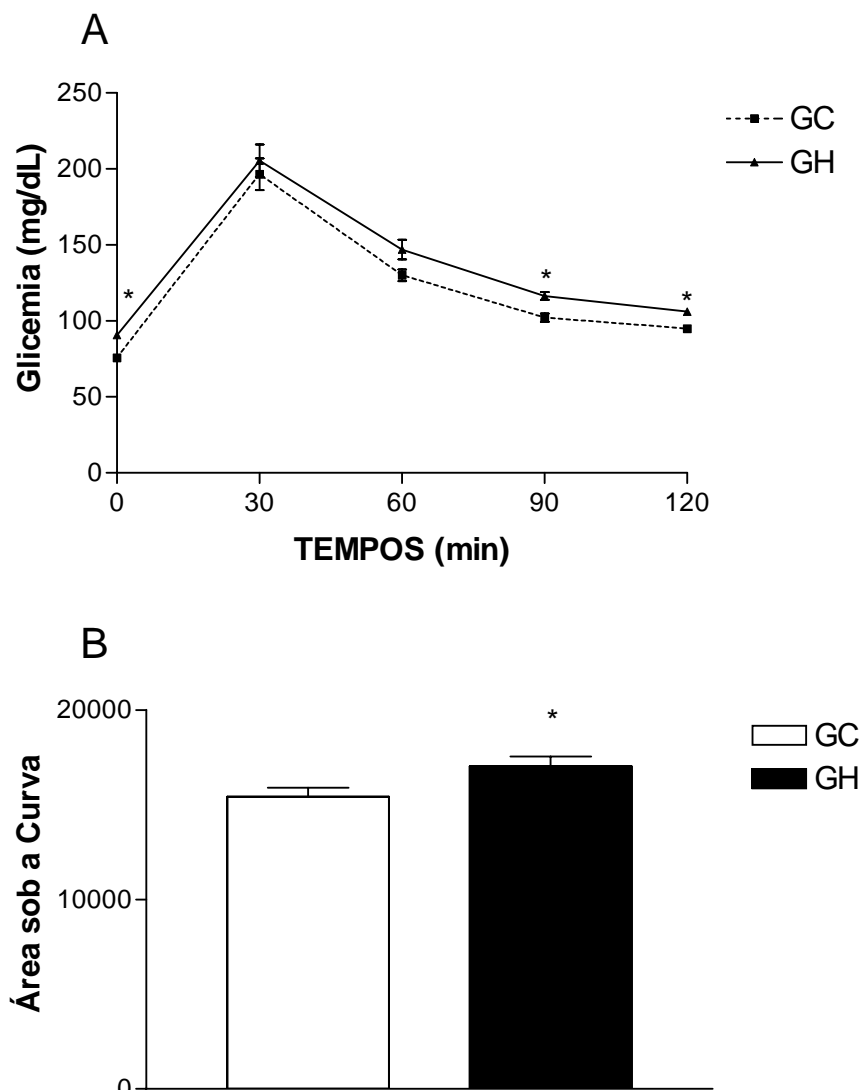


Figura 11. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da oitava semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n=15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

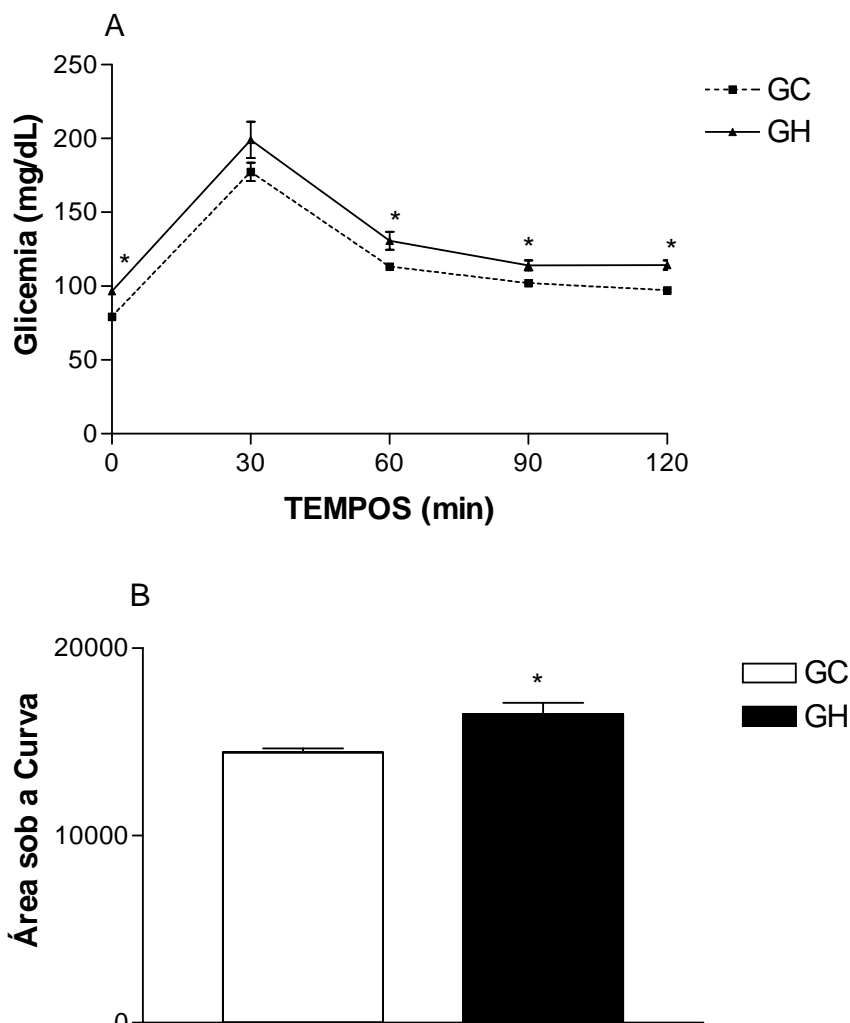


Figura 12. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e Área sob a curva do TTG (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n = 15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

#### 4.2.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI) (Pré – exercício)

No TTI inicial realizado após período de aclimação e antes do início do tratamento dietético, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose plasmática no GH quando comparado ao GC (figura 13A e B).

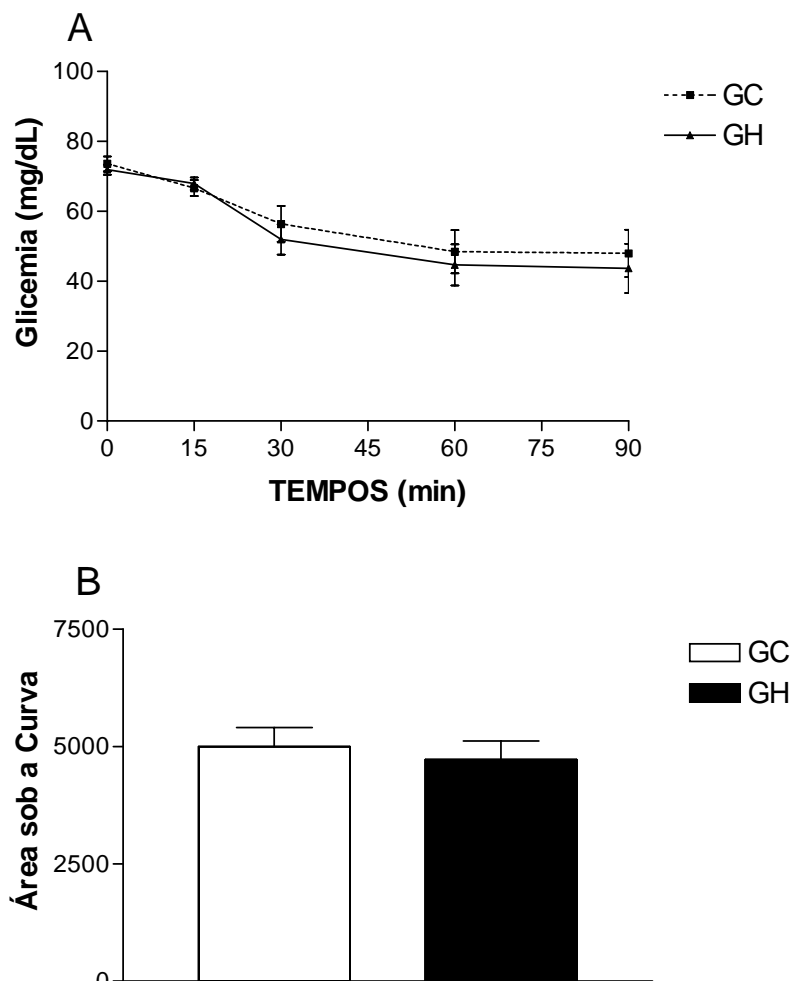


Figura 13. (A) Teste de Tolerância à Insulina (TTI) inicial e Área sob a curva do TTI inicial (B). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n= 15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle.

Entretanto, após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, o GH apresentou concentrações de glicose plasmática significativamente superiores quando comparado ao GC (figura 14A e B). O mesmo foi observado ao final da 12<sup>a</sup> semana (figura 15A e B).

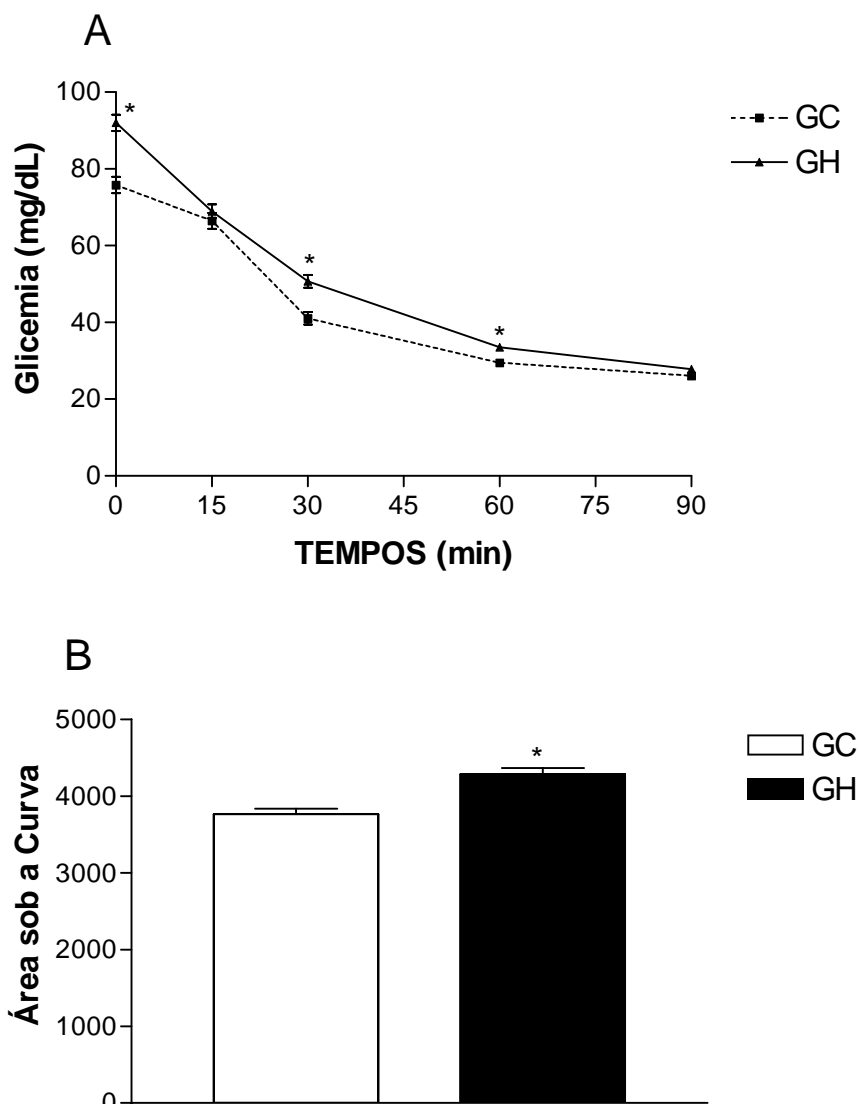


Figura 14. (A) Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da oitava semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica. (B) Área sob a curva do TTI. Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n = 15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

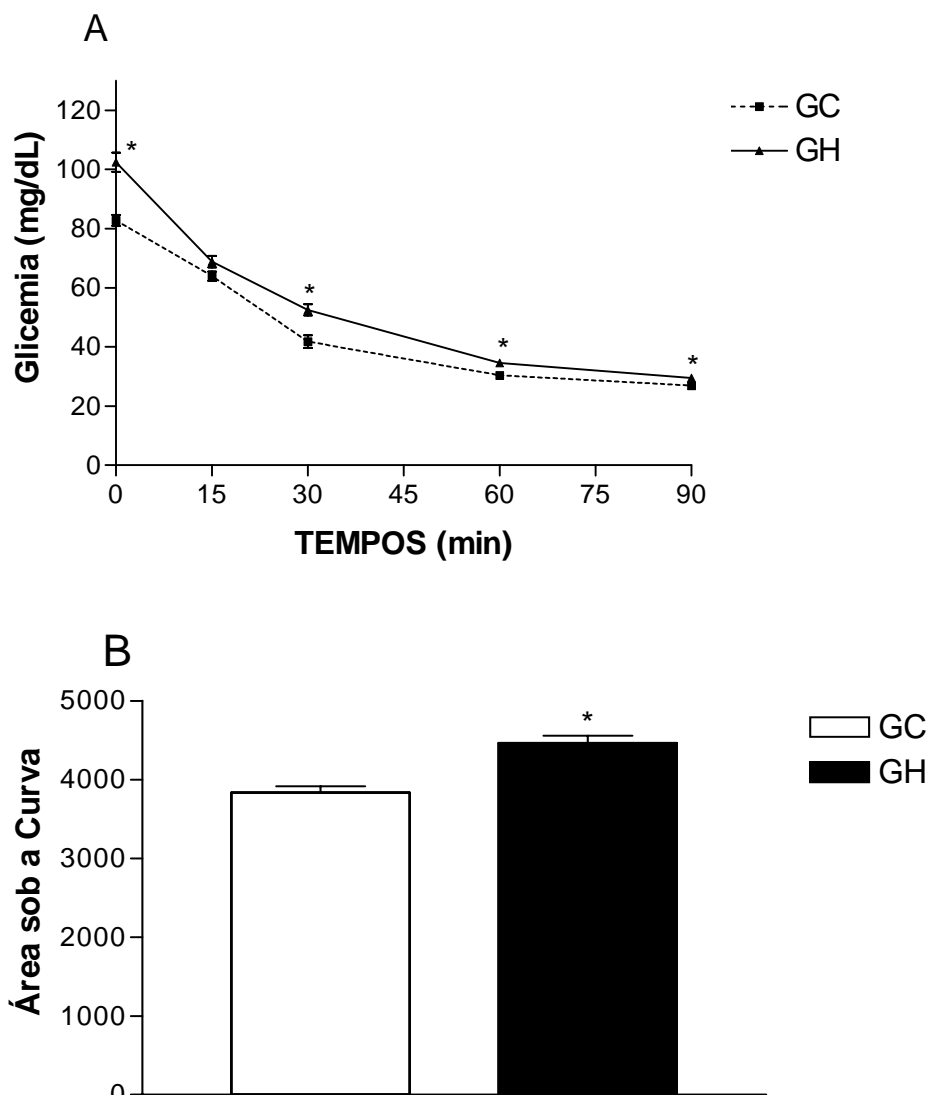


Figura 15. (A) Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica. (B) Área sob a Curva do TTI. Valores apresentados como média  $\pm$  EPM.  $n = 15$  ratos/grupo. GH=Grupo dieta hiperlipídica e GC=Grupo controle. \*  $P < 0.05$ , GH comparado ao GC.

### 4.2.3 Controle Glicêmico com exercício

#### 4.2.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG) Pré (12 semanas de tratamento dietético) e Pós – Exercício.

Após as 4 semanas de exercício de natação, os animais do Grupo Dieta Hiperlipídica Exercício (GHE) pós - exercício apresentaram redução significativa da área sob a curva no TTG quando comparado ao TTG antes do exercício (GHE pré -

exercício), mostrando aumento da sensibilidade à insulina neste grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam dieta padrão pré e pós - exercício (Figura 16 A)

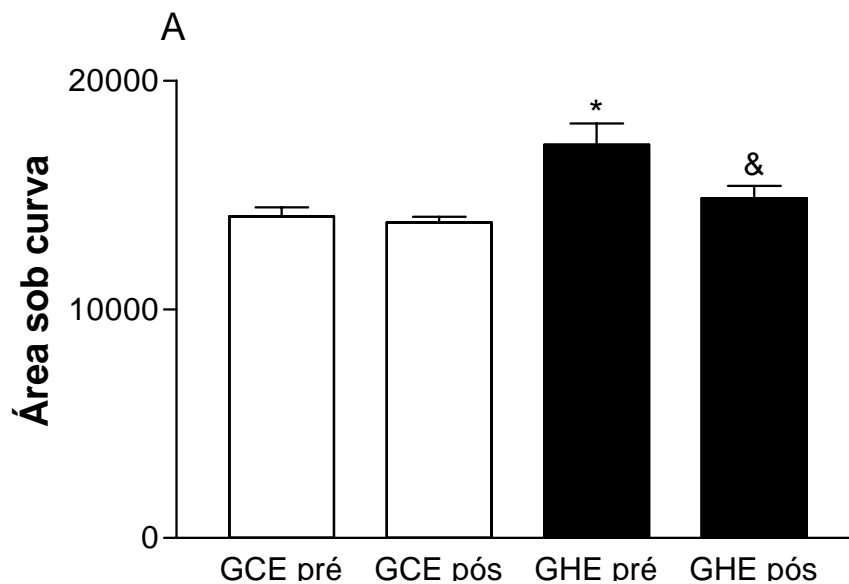


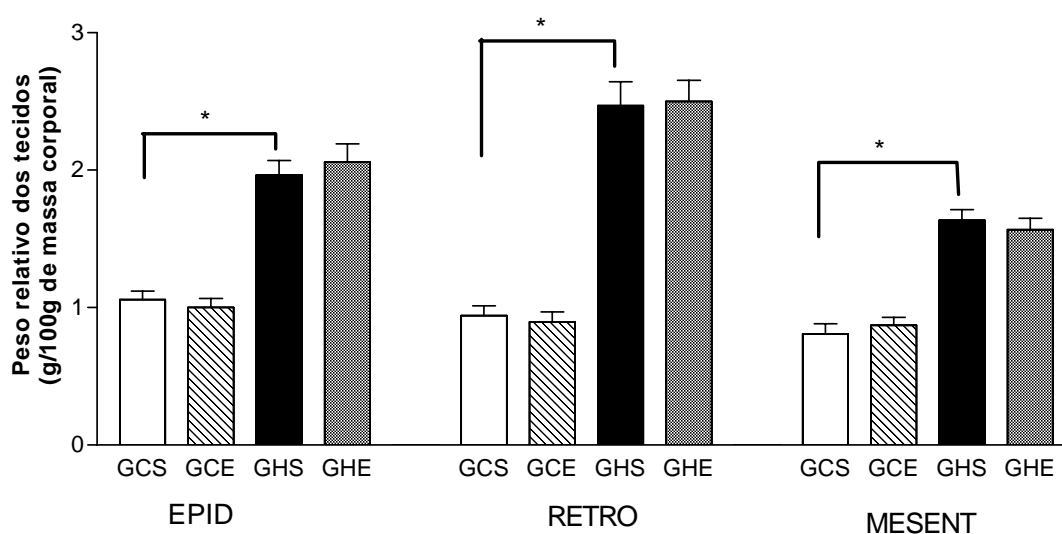
Figura 16. (A) Área sob a curva do TTG pré e pós - exercício. Valores apresentados como média  $\pm$  EPM. n= 6-8 ratos/grupo. GHE pré=Grupo dieta hiperlipídica antes do exercício, GHE pós=Grupo dieta hiperlipídica após o exercício, GCE pré=Grupo controle antes do exercício, GCE pós=Grupo controle após o exercício. & P < 0.05, GHE pós comparado ao GHE pré. \* GCE pré vs GHE pré.



### 4.3 Peso Relativo dos Tecidos

Nos grupos sob dieta hiperlipídica, houve desenvolvimento de obesidade, com aumento do peso dos tecidos adiposos branco, exceto o TAM. Após o exercício físico, não houve alteração da quantidade de tecido adiposo neste grupo. Entretanto, no grupo controle houve aumento do TAM após o exercício (figura 17 A e B)

#### A. Tecido Adiposo Branco



#### B. Músculo Gastrocnêmio e Tecido Adiposo Marrom

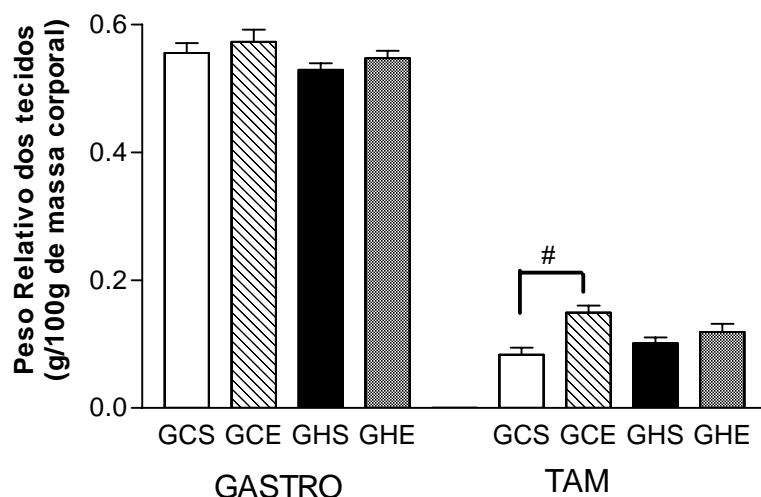


Figura 17. Peso relativo dos tecidos, em g/100g de peso corporal (A e B). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). (A) Gordura Intra-abdominal: epididimal (EPID), retroperitoneal (RETRO), mesentérica (MESENT); (B) gastrocnêmio (GASTRO), Tecido adiposo marrom (TAM). GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica.  $P < 0.05$ , \* GCS vs GHS; # GCS vs GCE.

## 4.6 Quantificação da Expressão do RNAm de Miostatina (MSTN) e Receptor de Activina RIIB (ActRIIB).

### 4.6.1 Músculo Gastrocnêmio Branco.

O treinamento diminuiu significativamente a expressão de MSTN no grupo que recebeu dieta padrão (GCE) comparado com o grupo sedentário (GCS) e diminuiu significativamente a expressão do receptor de MSTN no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (GHE) comparado com seu grupo sedentário (GHS) (Figura 18).

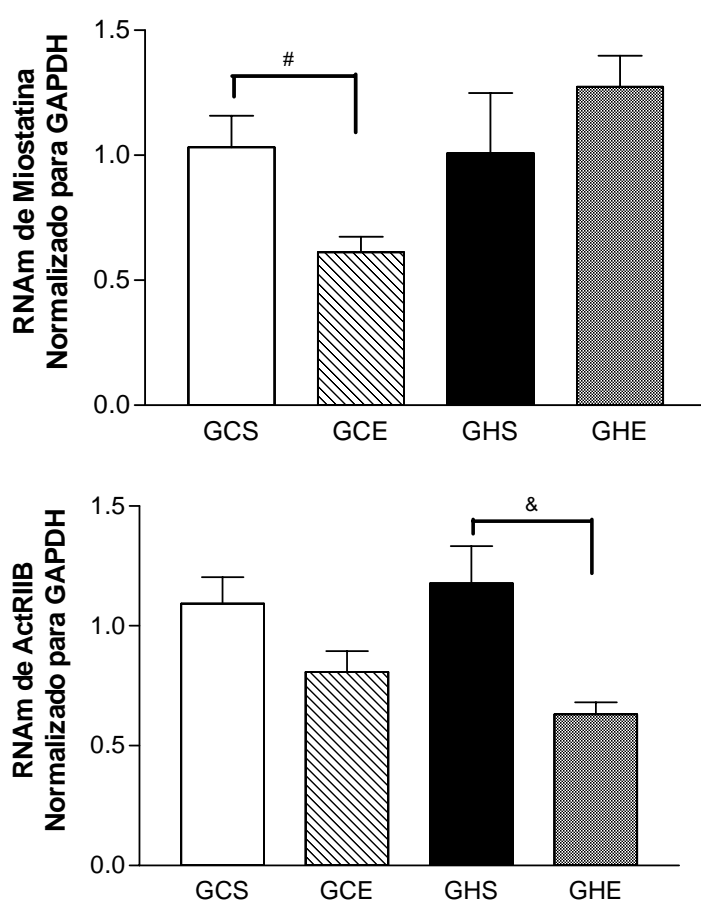


Figura 18. Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB no músculo de ratos. Valores são médias  $\pm$  erro padrão da média. GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.  $P < 0.05$ , \* GCS vs GHS; # GCS vs GCE; & GHS vs GHE

#### 4.6.2 Gordura Mesentérica

O tratamento com dieta hiperlipídica aumentou significativamente a expressão de MSTN no GHS (vs GCS). O treinamento diminuiu a expressão da MSTN e do seu receptor tanto no grupo controle (GCE) quanto no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (GHE) comparado com seus grupos sedentários, GCS e GHS respectivamente (Figura 19).

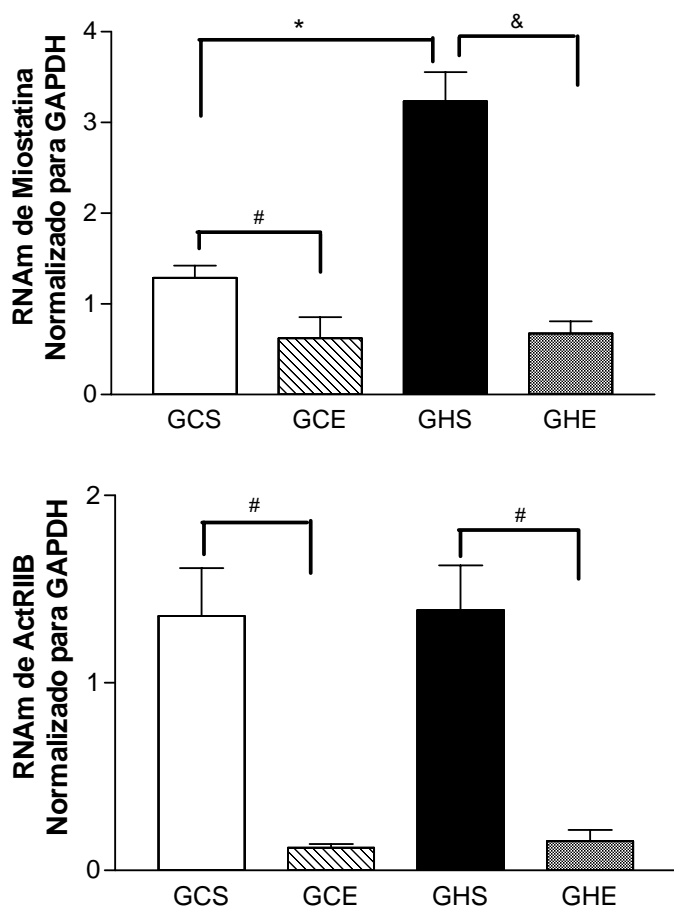


Figura 19. Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB na gordura mesentérica de ratos. Valores são médias  $\pm$  erro padrão da média. GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.  $P < 0.05$ , \* GCS vs GHS; # GCS vs GCE; & GHS vs GHE

### 4.6.3 Gordura Epididimal.

O tratamento com dieta hiperlipídica diminuiu significativamente a expressão da MSTN e do seu receptor no GHS (vs GCS). O treinamento aumentou significativamente a expressão da MSTN nos animais tratados com dieta hiperlipídica (GHE vs GHS) (Figura 20).

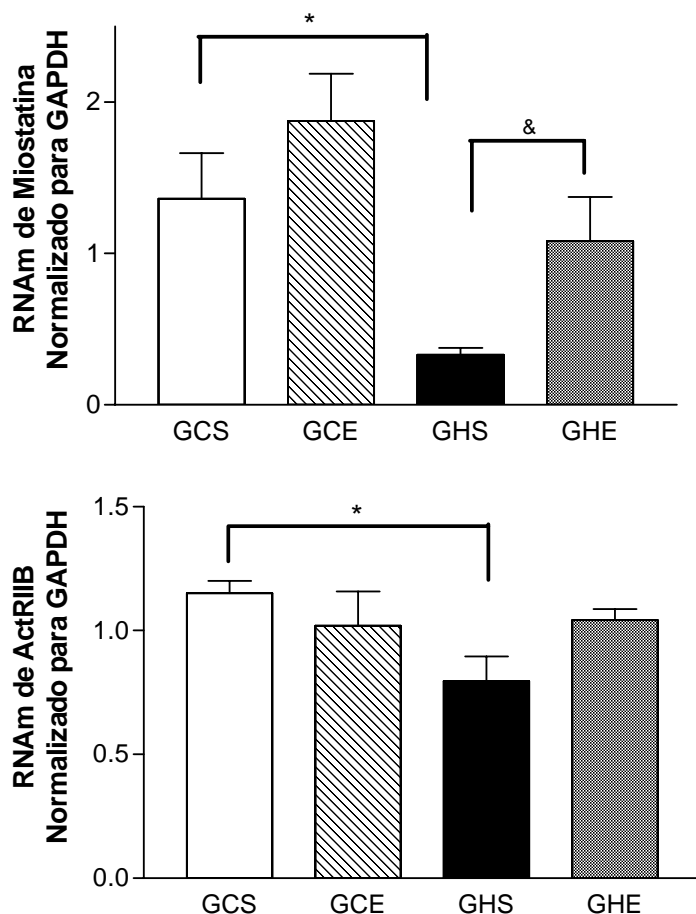


Figura 20. Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB na gordura epididimal de ratos. Valores são médias  $\pm$  erro padrão da média. GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício. \* GCS vs GHS; & GHS vs GHE

#### 4.6.4 Tecido Adiposo Marrom (TAM).

O tratamento com dieta hiperlipídica diminuiu significativamente a expressão da MSTN e do seu receptor no GHS (vs GCS). O treinamento aumentou significativamente a expressão da MSTN nos grupos GCE e GHE, comparado respectivamente com GCS e GHS, além de aumentar significativamente também a expressão do receptor de MSTN no GHE (vs GHS). Entretanto o treinamento diminuiu significativamente a expressão do receptor de MSTN no GCE (vs GCS) (Figura 21).

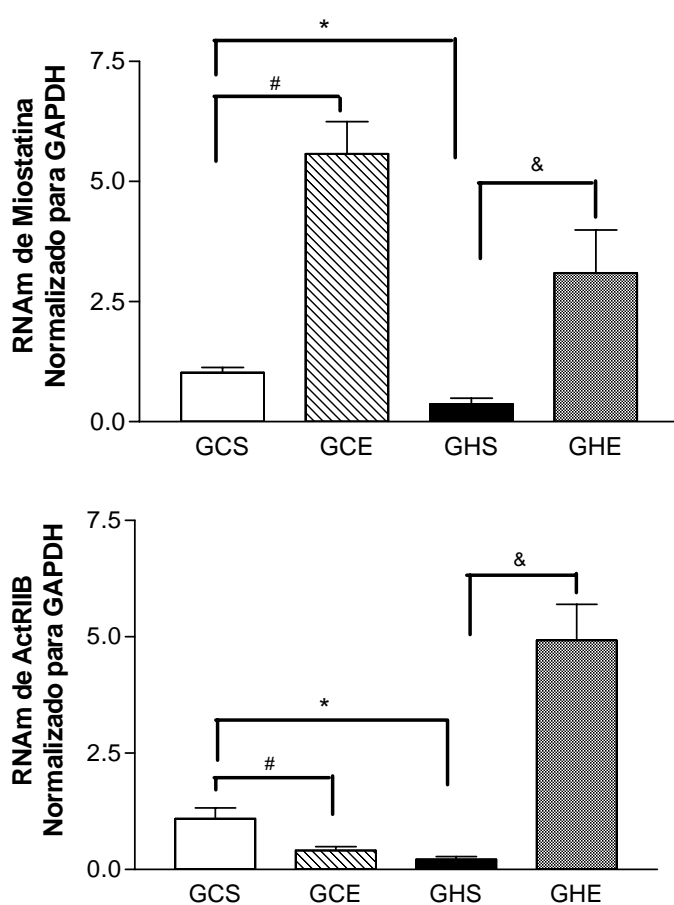


Figura 21. Expressão de RNAm da MSTN e ActRIIB no tecido adiposo marrom de ratos. Valores são médias  $\pm$  erro padrão da média. GCS=Grupo controle sedentário; GCE=Grupo controle exercício; GHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; GHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.  $P < 0.05$ , \* GCS vs GHS; # GCS vs GCE; & GHS vs GHE

## 5 DISCUSSÃO

A dieta hiperlipídica causou aumento significativo da massa corporal total e da quantidade de tecido adiposo nos animais (Figuras 4 e 17). Esses dados estão de acordo com os de Akiyama *et al* (1996), Kibenge e Chan (2002); Estadella *et al* (2004), Kretschmer *et al* (2005) e Duarte *et al* (2006). O fator dietético responsável pelo ganho de peso em animais alimentados com dieta hiperlipídica é controverso (Schrauwen e Westerterp, 2000). Segundo Gaíva *et al* (2001), o maior ganho de peso observado em animais submetidos à dieta hiperlipídica, mas com mesma quantidade de calorias, é atribuído a menor gasto energético necessário para deposição de gordura dos lipídios comparados aos carboidratos. Nesses animais, diminuição do consumo de alimento atribuída ao estímulo da secreção de fatores saciantes endógenos, como a colecistocinina, pelos lipídios da dieta, é compensada pela maior densidade calórica (French *et al*, 1995, Horn *et al*, 1996, McLaughlin *et al*, 1983).

Durante o período de exercício, observou-se diminuição da ingestão alimentar, na primeira e quarta semanas, apenas nos animais que receberam dieta padrão (figura 7). O mesmo foi observado por outros pesquisadores (Király *et al*, 2007). Martins *et al* (2007), observaram que após exercício de intensidade moderada ocorreu aumento nas concentrações do polipeptídeo YY (PYY, *polypeptide YY*), *glucagon-likepeptide-1* (GLP-1) e *pancreatic polypeptide* (PP). O aumento de PYY, GLP-1 e PP podem estar associados ao efeito anorexígeno do exercício. Flores *et al* (2006) mostraram que o exercício pode reduzir o apetite por ação mediada pela leptina no hipotálamo. Já Ropelle *et al* (2008), defendem que o aumento da ação da leptina no hipotálamo, após o exercício, está associado com a redução de apetite envolvendo a via de sinalização *AMP-activated protein kinase/ mammalian Target of Rapamycin* (AMPK/mTOR), que

são reguladores importantes do balanço energético celular e dos efeitos da leptina na ingestão alimentar.

O treinamento diminuiu o ganho de massa corporal total durante todo o período, em ambos os grupos (figura 6). Esta observação pode ser resultado do aumento da capacidade oxidativa do músculo e maior gasto energético (Estadella *et al*, 2004; Hawley e Houmard, 2004; Morris *et al*, 2008; Kretschmer *et al*, 2005). Entretanto, não foi observada diferença significativa na quantidade de tecido adiposo entre os animais sedentários e exercitados ao final da quarta semana de treinamento. A diminuição da massa corporal com exercício pode estar relacionada à redução da porcentagem de gordura total, sendo talvez a gordura subcutânea mais mobilizada durante o período de exercício do que a gordura visceral (Kretschmer *et al*, 2005).

O peso relativo do TAM nos animais sob dieta controle, que realizaram exercício, aumentou significativamente (figura 17). O mesmo foi observado por Guerra *et al* (2007). O TAM é rico em mitocôndrias, que são organelas essenciais em processos termogênicos por expressar a UCP 1. O exercício aumenta a expressão de UCP 1 e, portanto, pode aumentar a atividade termogênica do TAM (Oh *et al*, 2007). Entretanto, após o exercício, o grupo que recebeu dieta hiperlipídica não apresentou aumento significativo do peso relativo do TAM. Segundo Cinti (2005), a grande quantidade de TNF- $\alpha$ , encontrada em obesos induz aumento da taxa de apoptose no TAM. Ademais, na obesidade pode ocorrer transdiferenciação do TAM em tecido adiposo branco Cinti (2006).

As concentrações glicêmicas apresentadas pelos ratos alimentados com dieta hiperlipídica nos testes de tolerância à glicose (TTG) e tolerância à insulina (TTI) indicam o desenvolvimento de resistência insulínica (figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Akiyama *et al* (1996);

Chalkley *et al* (2002); Woods *et al* (2003) e Winzell *et al* (2007). Ratos alimentados com dieta rica em gordura desenvolvem aumento da adiposidade, resistência à insulina, hiperinsulinemia, leve hiperglicemia. Porém, não se tornam diabéticos, pois mecanismos compensatórios são induzidos, ocorrendo adaptação à redução da sensibilidade à insulina e aumento, tanto da secreção de insulina, como da massa de células  $\beta$  (Bernal-Mizrachi *et al*, 2001; Rossmeis *et al*, 2002; Drucker 2006). Takamoto *et al* (2008) destacam o papel do aumento da expressão de IRS-2, independente da insulina, como mecanismo adaptativo. Já, Fex *et al* (2007) sugerem que o aumento de volume mitocondrial está associado ao mecanismo compensatório das células  $\beta$ . Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a dieta rica em gordura lesa a função secretória pancreática de insulina, ocorrendo diminuição da resposta aguda da insulina ao estímulo com glicose e da expressão pancreática de GLUT2 e glucokinase (Kim *et al*, 1995; Ahrén *et al*, 1999; Chalkley *et al*, 2002).

Os mecanismos pelos quais a gordura da dieta em excesso pode levar à resistência insulínica parecem envolver disfunção do tecido adiposo. O tecido adiposo além de estocar energia, também tem importante papel no controle metabólico. Estas funções são reguladas por fatores adipocíticos endócrinos e parácrinos já conhecidos, como a leptina, adiponectina, resistina, TNF- $\alpha$  e receptores PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). O aumento da maioria desses fatores compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, atuando, principalmente, na sua cascata de sinalização e levando à resistência insulínica (Kahn *et al*, 2006). Ao contrário, em ratos submetidos à dieta hiperlipídica, a hiperexpressão de adiponectina mediada por adenovírus diminuiu o peso e a ingestão, que resultaram em melhora da sensibilidade insulínica periférica (Shkyaev *et al*, 2003).



O músculo, por sua vez, é um dos principais captadores de glicose responsáveis pela manutenção da homeostase glicêmica. O excesso de gordura na dieta pode levar ao acúmulo de gordura no músculo e alterar a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de insulina, com conseqüente diminuição da sinalização e ação da insulina (Storlien *et al*, 1993; Schmitz-Peiffer *et al*, 1997). Rosholt *et al* (1994) demonstraram que, em ratos submetidos à dieta rica em gordura, a translocação de glicose mediada por GLUT4 e estimulada pela insulina está diminuída no músculo. A dieta hiperlipídica afeta também as etapas da metabolização intracelular da glicose, diminuindo a glicólise e a síntese de glicogênio (Kim *et al*, 2000).

O exercício tem efeitos metabólicos opostos aos da dieta hiperlipídica. Os animais do GHE apresentaram menor resposta glicêmica ao TTG (figura 16). O treinamento aumenta a ação da insulina, aumenta a expressão de GLUT4, havendo aumento da translocação do GLUT4, que se deve ao aumento fosforilação de IRS-1, IRS-2, PI-3-Kinase e Akt (Kim *et al*, 2000; Hansen *et al*, 1998; Chibalin *et al*, 2000; Hernandez *et al*, 2000; Reynolds *et al*, 2000). Adicionalmente, parece haver também efeitos sobre as células  $\beta$  pancreáticas, preservando a massa de células  $\beta$  pelo aumento de proliferação (Király *et al*, 2006). Segundo dados de Leme *et al* (2007), ratos diabéticos que realizaram exercício de natação em curto prazo (4 semanas) reduziram as concentrações de glicose e recuperaram os estoques de glicogênio hepático. Também em 2007, Yaspelkis *et al* demonstraram que o exercício aeróbio (4 semanas) pode ter maior eficiência em ativar componentes da cascata de sinalização da insulina, com aumento da concentração de GLUT4 no músculo, aumento da proteína e fosforilação de IRS 1. E em 2008, Pauli *et al*, mostraram que ratos alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas, que realizaram apenas uma única sessão de exercício de natação, aumentaram a sensibilidade à insulina no músculo. Já, Kibeng e Chan (2002)

demonstraram que a dieta hiperlipídica diminui os efeitos do exercício em ratos com obesidade pré-existente, e pode exigir maior intensidade de exercício para melhorar a tolerância à glicose.

A expressão do RNAm da MSTN aumentou significativamente apenas na gordura mesentérica e ocorreu o contrário na gordura epididimal e TAM dos ratos alimentados com dieta rica em gordura, não tendo sido observada alteração significativa da expressão de MSTN no tecido muscular nestes animais. Além disso, houve diminuição significativa da expressão do receptor de MSTN na gordura epididimal e TAM. Após o treinamento, observamos diminuição da expressão da MSTN no músculo e gordura mesentérica e o seu aumento no TAM, assim como diminuição significativa da expressão do receptor de MSTN na gordura mesentérica e TAM nos animais controles. Nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, após o treinamento, houve diminuição da expressão da MSTN na gordura mesentérica e aumento na gordura epididimal e TAM. A expressão do receptor de MSTN nesses animais diminuiu no músculo e gordura mesentérica, e o inverso foi observado no TAM (figuras 18, 19, 20, 21).

Os nossos resultados mostram relação inversa da expressão de MSTN e seu receptor entre a gordura mesentérica e a gordura epididimal e TAM. A gordura mesentérica pode estar mais diretamente relacionada com metabolismo energético, pois recobre órgãos importantes como pâncreas, estômago e intestino. Já a gordura epididimal, apesar de ser considerada gordura visceral, atua como coxim de proteção do epidídimo, e pode estar relacionada à produção de hormônios sexuais. O TAM que é encontrado principalmente na região intraescapular, é responsável pela termogênese, sendo que, essa relação inversa da expressão da MSTN e ActRIIB pode ser devido às diferentes funções que cada um desses tecidos exercem no organismo.

O achado do aumento da expressão de MSTN no tecido adiposo branco, em ratos obesos, é confirmado por outros autores. Em recente publicação, Allen *et al* (2008), demonstraram aumento da expressão de MSTN e ActRIIB na gordura visceral e subcutânea e de MSTN, no músculo tibial anterior de animais com obesidade genética (camundongos *ob/ob*). Em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, foi observado aumento da expressão de MSTN apenas no músculo tibial anterior, mas não na gordura subcutânea. Entretanto, o autor não menciona dados em relação à gordura visceral.

A MSTN é um potente inibidor da miogênese, entretanto, o papel da MSTN no tecido adiposo e no metabolismo energético é pouco conhecido, até o momento, e os dados disponíveis são controversos. Em animais transgênicos, em que a expressão da MSTN foi inibida ou naqueles, em que a sua ação foi antagonizada por hiperexpressão do seu propeptídeo, demonstram-se aumento da massa muscular, diminuição do tecido adiposo e aumento da sensibilidade à insulina, quando submetidos à dieta hiperlipídica (McPherron e Lee, 2002; Lin *et al*, 2002; Zhao *et al*, 2005; Hamrick *et al*, 2006; Guo *et al*, 2009). Esses dados sugerem que a MSTN possui papel na regulação da homeostasia energética no músculo e no tecido adiposo e que a sua inibição promove características metabólicas benéficas. Entretanto, animais transgênicos com supressão da expressão de folistatina também apresentam diminuição da gordura visceral, maiores tolerância à glicose e sensibilidade insulínica (Mukherjee *et al*, 2007). A ausência do antagonismo que é naturalmente exercido pela folistatina leva ao aumento da bioatividade de activina e miostatina. Segundo Stolz *et al* (2008), camundongos que receberam dose baixa de anticorpo antimioestatina exibiram aumento da massa muscular e nenhuma alteração ocorreu no tecido adiposo, sugerindo que a MSTN não influencia a mobilização ou

utilização dos estoques de gordura. Esses dados são contraditórios e até o momento, desconhecem-se os mecanismos.

Estudos *in vitro* sugerem que o efeito da MSTN sobre a adipogênese depende do estágio de diferenciação celular, sendo a sua ação evidente em fase inicial e levando a formação de células que mantêm padrão de expressão de adipócitos imaturos (Feldman *et al*, 2006). A ação inibitória da MSTN sobre a diferenciação de pré-adipócitos é atribuída, em parte, à alteração da regulação de C/EBP e PPAR $\gamma$ , importantes fatores de transcrição para a diferenciação adipocítica (Kim *et al*, 2001). *In vivo*, a inibição da MSTN induzida pelo seu propeptídeo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica aumenta a expressão de adiponectina, PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$  em gordura epididimal (Suzuki *et al*, 2008).

Os mecanismos de sinalização metabólica entre músculo e tecido adiposo há muito são buscados. Interações e sinalização intracelular entre tecido adiposo e músculo esquelético ocorrem durante a miogênese, lipogênese e lipólise. Sinais celulares podem ser gerados pelo aumento da necessidade energética do músculo esquelético e o reservatório energético da gordura dietética ser direcionado para o músculo (Yang e Zhao, 2006). Segundo McPherron e Lee Se-Jin (2002), a abolição da sinalização da MSTN no músculo afeta a atividade de um hipotético segundo mensageiro liberado pelo músculo que atuaria no tecido adiposo. Adicionalmente, hipotetiza-se que a MSTN poderia agir, direta ou indiretamente no sistema nervoso central para regular suas ações no tecido adiposo. Entretanto, até o momento, não há evidências que comprovem estas hipóteses.

Em recente publicação, Wilkes *et al* (2009) observaram melhora significativa da sensibilidade insulínica em fígado e músculo de camundongos com mutação induzida no gene da MSTN e diminuição de sua expressão, associada à redução da expressão de

TNF- $\alpha$  e IL-6 em músculo e tecido adiposo. O tratamento desses animais com MSTN recombinante aumentou as concentrações de TNF- $\alpha$  e levou à resistência insulínica. Esses dados sugerem assim a função de “adipocina” da MSTN.

Com o objetivo de analisar o cenário metabólico de atuação da MSTN, Guo *et al* (2009) analisaram os efeitos metabólicos da inibição da expressão de MSTN no músculo e tecido adiposo, separadamente. Eles demonstraram que a inibição da sinalização da miostatina no músculo esquelético, e não no tecido adiposo, resultou em aumento da sensibilidade insulínica, sugerindo que a redução do tecido adiposo é um efeito indireto de mudanças metabólicas ocorridas no músculo esquelético.

A expressão da miostatina, em resposta ao exercício, tem sido estudada no homem e em modelos animais. Estes estudos têm demonstrado diminuição da expressão de MSTN e de seu receptor no músculo em resposta a exercício de resistência de longa e curta duração, além de ser terem sido observadas reduções da MSTN na circulação (Matsakas e Diel, 2005; Matsakas *et al*, 2005; Heinemeier *et al*, 2007; Hulmi JJ *et al*, 2007; Walker *et al*, 2004). A imunoneutralização da MSTN em combinação com exercício, em camundongos idosos, resultou em aumento da sensibilidade à insulina, (LeBrasseur *et al*, 2009).

No presente estudo, observamos diminuição da expressão da MSTN no músculo gastrocnêmio branco após o exercício apenas nos animais controle, e diminuição da expressão do receptor de MSTN nos animais tratados com dieta hiperlipídica. Matsakas *et al* (2006) mostraram que após exercício de natação, agudo ou crônico, ocorre diminuição da expressão da MSTN na fibra muscular branca. Hulmi *et al*, 2007, a expressão do ActRIIB diminuiu significativamente em humanos logo após uma única sessão de exercício de resistência. Já Willoughby (2004) observaram aumento da

expressão da MSTN após treinamento de resistência em humanos no músculo, porém com diminuição do receptor de MSTN (ActRIIB).

A observação do aumento da expressão da MSTN no TAM após o exercício é inédita. Há raros relatos na literatura sobre o comportamento metabólico do TAM no exercício. Kahara *et al* (2002) observaram associação entre polimorfismos da UCP-1, que é unicamente expressa no TAM, e aumento da tolerância à glicose mediada por exercício, em humanos. O papel do TAM no metabolismo energético também é pouco conhecido, apesar da sua função termogênica ressaltada (Sell *et al*, 2004; Ricquier, 2006).

Há evidências de que a MSTN regula a sinalização da PI-3-kinase/Akt sugerindo ser este um possível mecanismo de ação sobre crescimento celular e metabolismo (Zhao *et al*, 2005; Morissette *et al*, 2006; Yang *et al*, 2007; Ji *et al*, 2008; Guo *et al*, 2009; Wilkes *et al*, 2009).

Finalmente, deve ser lembrado que por ser uma proteína secretada e circulante, a MSTN pode ter ação endócrina e parácrina. Ademais, assim como outros membros da família TGF- $\beta$ , a sua ação é regulada por inibidores intra e extracelulares (Hill *et al*, 2002; Forbes *et al*, 2006). É, portanto, fundamental que esses reguladores da bioatividade da MSTN sejam também investigados para que o seu papel metabólico seja melhor compreendido.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados mostram que a expressão da MSTN está aumentada em ratos que receberam dieta hiperlipídica na gordura mesentérica e o exercício de natação, além de melhorar a sensibilidade à insulina nos animais resistentes à insulina induzida pela dieta hiperlipídica, mostrou-se capaz de diminuir a expressão do ActRIIB no músculo, e gordura mesentérica e aumentar a expressão tanto de MSTN quanto de ActRIIB no TAM e gordura epididimal. Os dados indicam alteração da expressão de MSTN e ActRIIB na obesidade dietética e exercício, em importantes cenários metabólicos: músculo, tecido adiposo branco e marrom.

## 7 REFERÊNCIAS

ACHTEN, J.; GLEESON, M. and JEUKENDRUP A.E. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 92-97, 2002

AHRÉN, B. et al. Islet Perturbations in Rats Fed a High-Fat Diet. **Pancreas**, 18: 75-83, 1999.

AKIYAMA, T. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 31: 27-35, 1996.

ALLEN, D.L. et al. Myostatin, activin receptorIIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: 918-E927, 2008.

AMIROUCHE, A, et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, ;150(1): 286-94, 2008.

AMTHOR H. et al. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. **PNAS**, 106: 7479–7484, 2009.

ARTAZA, J.N. et al. Myostatin Inhibits Myogenesis and Promotes Adipogenesis in C3H10 T(1/2) Mesenchymal Multipotent Cells. **Endocrinology**, 146(8): 3547–3557, 2005.

BERNAL-MIZRACHI E. et al. Islet cell expression of constitutively active Akt1/PKB induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hiperinsulinemia. **The Journal of Clinical Investigation**, 108, 1631 – 1638, 2001.

BRUCE, C.R. and HAWLEY JA. Improvements in insulin resistance with aerobic exercise training: a lipocentric approach. **Med Sci Sports Exerc** 36: 1196-1201, 2004.



CHALKLEY, S.M. et al. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 282: 1231-1238, 2002.

CHELH, I. et al. Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. **BioMed Central Genomics**, 10: 196, 2009.

CHIBALIN, A.V. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: Differential effects on insulin receptor substrates 1 and 2. **PNAS**, 97: 38-43, 2000.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins, Eukotrienes and Essential Fatty Acids**, 73: 9-15. 2005.

CINTI, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 16: 569-574, 2006.

CYPESS, A. M. M.D. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **Massachusetts Medical Society**, 360: 1509–1517, 2009.

DEBIÈVE F, HINCK L, BIARD JM, BERNARD P, HUBINONT C. Activin receptor expression and induction of apoptosis in rat blastocysts in vitro. **Hum Reprod.**, 21(3): 618-23, 2006.

DESPRÉS, J.P. and LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, 444: 881-887, 2006

DOMINIQUE, J.E. AND GÉRARD, C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. **Exp Cell Res.**, 312(13):2401-14, 2006

DRUCKER, D.J. The biology of incretin hormones. **Cell Metab.**, 3: 153-165, 2006.

DUARTE A.C.G.O. et al. High-fat diet and secretory capacity of insulin in rats. **Revista de Nutrição**, 19(3):341-348, 2006

DULLOO, A.G. A role for suppressed skeletal muscle thermogenesis in pathways from weight fluctuations to the insulin resistance syndrome. **Acta Physiol Scand**, 184: 295-307, 2005.

ESTADELLA D. et al. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Nutrition**, 20: 218–224, 2004.

FELDMAN BJ, STREEPER RS, FARESE RV, YAMAMOTO KR. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. **Proc Natl Acad Sci USA** 103: 15675-15680, 2006.

FEX, M. et al. Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, 50: 74–83, 2007.

FLORES M.B.S. et al. Exercise Improves Insulin and Leptin Sensitivity in Hypothalamus of Wistar Rats. **Diabetes**, 55: 2554-2561, 2006.

Forbes D, et al. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. **J Cell Physiol**, 206(1): 264-72, 2006.

FRENCH SJ, et al. Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma cholecystokinin. **Br J Nutr.**, 73(2): 179-89, 1995.

FURUKAWA M, NOBUSAWA R, SHIBATA H, ETO Y, KOJIMA I. Initiation of insulin secretion in glucose-free medium by activin A. **Mol Cell Endocrinol** 113: 83-87, 1995b.

GAÍVA M.H.G. et al. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, 86: 371-377, 2001.

GARMA, T. et al. Similar acute molecular responses to equivalent volumes of isometric, lengthening, or shortening mode resistance exercise. **J Appl Physiol**, 102: 135-143, 2007.

GONZALEZ-CADAVID, N.F and BHASIN S. Role of myostatin in metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 7: 451-457, 2004.

GONZALEZ-CADAVIT NF, TAYLOR WE, YARASHESKI K, ET AL. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proc Natl Acad Sci USA** **95**: 14938-14943, 1998.

GUERRA, R.L.F. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, 6:16, 2007.

GUO, T, et al. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity **PLoS One.**, 4(3): 4937, 2009

HAMRICK MW, et al. Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. **J Bone Miner Res.**, 21(3): 477-83, 2006.

HANSEN, P.A. et al. Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. **The American Physiology Society**, 1218-1222, 1998.

HAWLEY, J.A., and HOUMARD, J.A. Introduction-Preventing Insulin Resistance through Exercise: A Cellular Approach. **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, 1187-1190, 2004.

HEINEMEIER KM, OLESEN JL, SCHJERLING P, HADDAD F, LANGBERG H, BALDWIN KM, KJAER M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **J Appl Physiol** **102**: 573-581, 2007.

HERNANDEZ, J.M.; FEDELE, M.J.: and FARRELL P.A. Time course evaluation of protein synthesis and glucose uptake after acute resistance exercise in rats. **J Appl. Physiol.**, 88: 1142-1149, 2000.

HILL JJ, DAVIES MV, PEARSON AA, WANG JH, HEWICK RM, WOLFMAN NM, QIU Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. **J Biol Chem** **277**: 40735-40741, 2002.

HOLMES, B. and DOHM, L.D. Regulation of GLUT4 Gene Expression during Exercise, **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, 1202-1206, 2004.

HORN CC, TORDOFF MG, FRIEDMAN MI. Does ingested fat produce satiety? **Am J Physiol.**, 270: R761-5, 1996.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, 444: 860-867, 2006.

HULMI JJ, AHTIAINEN JP, KAASALAINEN T, POLLANEN E, HAKKINEN K, ALEN M, SELANNE H, KOVANEN V, MERO AA. Postexercise myostatin and activin Iib mRNA levels: effects of strength training. **Med Sci Sports Exerc** 39: 289-297, 2007.

JI M, et al. Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway. **Cell Signal.**, 20(8): 1452-8, 2008.

KADOWAKI, T. et al. Molecular Mechanism of Insulin Resistance and Obesity. **Biol Med**, 228: 1111–1117, 2003.

KAHARA, T. et al. Prediction of exercise-mediated changes in metabolic markers by gene polymorphism. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 57: 105-110, 2002.

KAHN, C.H. et al. Jolin's Diabetes Mellitus. 14a ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

KAHN, S.E.; HULL, R.L. and UTZSCHNEIDER K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, 444: 840-846, 2006.

KATSANOS, C. S. Lipid-Induced Insulin Resistance in the Liver. Role of Exercise. **Sports Med**, 34 (14): 955-965, 2004

KELLEY, D.E, MANDARINO LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes.**, 49(5): 677-83, 2000

KIBENGE, M.T. and CHAN, C.B. The Effects of High-Fat Diet on Exercise-Induced Changes in Metabolic Parameters in Zucker fa/fa Rats. **Metabolism**, 51: 708-715, 2002.

KIM HS, et al. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. **Biochem Biophys Res Commun.**, 281(4): 902-6, 2001.

KIM Y, et al. Effect of high-fat diet on the gene expression of pancreatic GLUT2 and glucokinase in rats. **Biochem Biophys Res Commun.** , 208(3): 1092-8, 1995.

KIM, C.H. et al. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 278: 977- 984, 2000.

KIM, SK, HEBROK M, LI E, OH SP, SCHREWE H, HARMON EB, LEE JS, MELTON DA. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. **Genes Dev** **14**: 1866-1871, 2000.

KIRÁLY, M.A. et al. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker Diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metabolism Clinical and Experimental**, 56: 732–744, 2007.

KOCAMIS H, KILLEFER J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domest Anim Endocrinol.**, 23(4): 447-54, 2002.

KOLLIAS, H.D. AND MCDERMOTT, J.C. Transforming growth factor- $\beta$  and myostatin signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, 104: 579–587, 2008.

KRAMER HF and GOODYEAR LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol.**, 103(1): 388-95, 2007

KRETSCHMER, B.D. et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, 76: 1553–1573, 2005.

KROOK, A.; WALLBERG-IENRIKSSON, H.; ZIERATH J.R. Sending the signal: Molecular mechanism regulation glucose uptake. **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, 1212 – 1217, 2004.

LEBRASSEUR, N.K. et al. Myostatin Inhibition Enhances the Effects of Exercise on Performance and Metabolic Outcomes in Aged Mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 2009.

LEE SJ, REED LA, DAVIES MV ET AL. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. **Proc Natl Acad Sci** **102**: 18117-18122, 2005.

LEME, J.A.C.A. et al. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in the diabetics rats. **Grow Factors**, 25: 9-14, 2007.

LI L, YI Z, SENO M, KOJIMA I. Activin A and betacellulin. Effect on regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells in neonatal streptozotocin-treated rats. **Diabetes** **53**: 608-615, 2004.

LIN J, ARNOLD HB, DELLA-FERA MA, AZAIN MJ, HARTZELL DL, BAILE CA. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. **Biochem Biophys Res Commun** **291**: 701-706, 2002.

LIVAK, K.J. and SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **METHODS**, 25: 402 – 408, 2001.

LUND, S. et al. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92: 5817-5821, 1995.

MARTINS, C. et al. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. **Journal of Endocrinology**, 193: 251–258, 2007.

MASSAGUÉ J. TGF- $\beta$  signal transduction. **Annu Rev Biochem** **67**: 753-791, 1998.

MATSAKAS A, DIEL P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. **Int J Sports Med** **26**: 83-89, 2005.

MATSAKAS A, FRIEDEL A, HERTRAMPF T, DIEL P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. **Acta Physiol Scand** **183**: 299-307, 2005.

MATSAKAS, A. et al. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. **Exp Physiol**, 91.6: 983-994, 2006.

MCLAUGHLIN CL, PEIKIN SR, BAILE CA. Food intake response to modulation of secretion of cholecystinin in Zucker rats. **Am J Physiol.**, 244(5): R676-85, 1983.

MCPHERRON AC, LEE SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **J Clin Invest** **109**: 595-601, 2002.

MCPHERRON, A. AND LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12457-12461, 1997.

MCPHERRON, A.; LAWLER, A.M. e LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. **Nature**, 387: 83-90, 1997.

MILAN G, DALLA NORA E, PILON C, PAGANO C, GRANZOTTO M, MANCO M, MINGROVE G, VETTOR R. Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2724-2727, 2004.

MITCHELL MD, OSEPCHOOK CC, LEUNG K, MCMAHON CD, BASS JJ. Myostatin is a human placental product that regulates glucose uptake. **J Clin Endocrinol Metab** **91**: 1434-1437, 2006.

MORRIS, R.T. et al. Exercise-induced attenuation of obesity, hyperinsulinemia, and skeletal muscle Lipid peroxidation in the OLETF rat. **J Appl Physiol**, 04: 708 - 715, 2008.

MORRISSETTE, M.R., et al. Myostatin regulates Cardiomyocyte Growth Through Modulation of Akt Signaling. **Circ Res.**, 99: 15-24, 2006.

MUKHERJEE A, SIDIS Y, MAHAN A, RAHER MJ, XIA Y, ROSEN ED, BLOCH KD, THOMAS MK, SCHNEYER AL. FSTL3 deletion reveals roles for TGF- $\beta$  family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. **Proc Nat Acad Sci** **104**: 1348-1353, 2007.

OAKES, N.D. et al. Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. **Diabetes.**, 46(12): 2022-8, 1997.

OH K.S., KIM E.Y., YOON M. AND LEE C.M.. Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. **EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE**, 39: 385-394, 2007

PARK, J.J. Et al. GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. **Physiol Genomics**, 27: 114-121, 2006.

PAULI, J.R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinaseB/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J Physiol**, 586.2: 659-671, 2008.

REYNOLDS IV, T.H. et al. Transient enhancement of GLUT-4 levels in rat epitrochlearis muscle after exercise training. **J Appl Physiol**, 88: 2240-2245, 2000.

RICQUIER D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. **C. R. Biologies**, 329: 578–586, 2006.

RODGARKIA-DARA C, VEJDA S, ERLACH N, LOSERT A, BURSCH W, BERGER W, SCHULTE-HERMANN R, GRUSCH M. The activin axis in liver biology and disease. **Mut Res** 613: 123-137, 2006.

ROPELLE E.R. et al. Central Exercise Action Increases the AMPK and mTOR Response to Leptin. **PLoS ONE**, 3: e3856, 2008.

ROSEN, E. D. and SPIEGELMAN, M.. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, 444: 847-853, 2006.

ROSHOLT MN, KING PA, HORTON ES. High-fat diet reduces glucose transporter responses to both insulin and exercise. **Am J Physiol.**, 266: R95-101, 1994

ROSSMEISL, M.; RIM, J.S.; KOZA, R.A. AND KOZAK, L.P. Variation in Type 2 Diabetes Related Traits in Mouse Strains Susceptible to Diet-Induced Obesity. **Diabetes**, 52, 2003.

SAKAMOTO, K. and GOODYEAR, L.J. Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **J Appl Physiol** 93: 369-383, 2002.

SCHMITZ-PEIFFER C, et al. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. **Diabetes.**, 46(2): 169-78, 1997.



SCHMITZ-PEIFFER C, et al. Reversal of chronic alterations of skeletal muscle protein kinase C from fat-fed rats by BRL-49653. **Am J Physiol.**, 273: E915-21, 1997.

SCHRAUWEN, P. and WESTERTEP, K.R. The role of high-fat diet and physical exercise in the regulation of body weight. **British Journal of Nutrition**, 84: 427-427, 2000.

SELL, H.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36: 2098–2104, 2004.

SENE-FIORESE, M et al. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. **Obesity**.16(10): 2217-22, 2008

SHAFRIR, E.; ZIV, E. and MOSTHAF, L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. **Ann N Y Acad Sci**. 892: 223-46, 1999.

SHKLYAEV S. et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. **PNAS**, 100: 14217–14222, 2003.

SHOELSON, SE; LEE, I. and YUAN M. 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.

SPRIET, L.L. AND WATT, M.J. Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. **Acta Physiol Scand**, 178:443–452, 2003

STOLZ, L.E. et al. Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 10: 135–142, 2008.

STORLIEN LH, et al. High fat diet-induced insulin resistance. Lessons and implications from animal studies. **Ann N Y Acad Sci.**, 683: 82-90, 1993

SUZUKI, S.T.N.; ZHAO, B.; YANG, J. Enhanced muscle by myostatin propeptide increases adipose tissue adiponectin, PPAR- $\alpha$ , and PPAR- $\gamma$  expressions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 369: 767-773, 2008.

TAKAMOTO, I. et al. Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory  $\beta$ -cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 10: 147–156, 2008.

THOMAS, M et al. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 40235-40243, 2000.

TREMBLAY F. et al. Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Rats Is Associated With Alterations in Both Akt/Protein KinaseB and Atypical Protein Kinase C Activities. **Diabetes**, 50: 1901-1910, 2001

TSUCHIDA K. Activins, myostatin and related TGF- $\beta$  family members as novel therapeutics targets for endocrine, metabolic and immune disorders. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord** 4: 157-166, 2004.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D. et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **Massachusetts Medical Society**. 360 (15): 1500–1508, 2009

VIRTANEN, K. A. M.D et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **Massachusetts Medical Society**, 360: 1518–1525, 2009.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A. and MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 1389-1394, 2002.

WALKER K.S. et al. Resistance Training Alters Plasma Myostatin but not IGF-1 in Healthy Men. **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, 787-793, 2004.

WILKES, J.J. et al. Loss-of-Function Mutation in Myostatin Reduces Tumor Necrosis Factor Production and Protects Liver Against Obesity-Induced Insulin Resistance **Diabetes**, 58: 1133–1143, 2009

WILLOUGHBY DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. **Med Sci Sports Exerc.**, 36(4): 574-82, 2004.

WINZELL, M.F.; MAGNUSSON, C.; AHRÉN. B. Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high-fat feeding-induced glucose intolerance in mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, 56: 122–128, 2007.

WOODS S.C. et al. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133: 1081–1087, 2003.

YAMAOKA T, IDEHARA C, YANO M, MATSUSHITA T, YAMADA T, LI S, ET AL. Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. **J Clin Invest** 102: 294-301, 1998.

YANG, et al. Myostatin Induces Cyclin D1 Degradation to Cause Cell Cycle Arrest through a Phosphatidylinositol 3- Kinase/Akt/GSK-3  $\beta$  Pathways and Is Antagonized by Insulin-like Growth Factor 1. **Journal of Biology Chemistry**, 282: 3799-3808, 2007.

YANG, J. and ZHAO, B. Postnatal Expression of Myostatin Propeptide cDNA Maintained High Muscle Growth and Normal Adipose Tissue Mass in Transgenic Mice Fed a High-Fat Diet. **Mol. Reprod. Dev.**, 73: 462–469, 2006.

YASPELKIS III, B.B. et al. Exercise reverses high-fat diet-induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in skeletal muscle. **AmJ Physiol Endocrinol Metab** 293: 941-949, 2007.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T. and KONDO, M. Brown Adipose tissue and Metabolic Rate Contribute to the Variation in Obesity among Rats Fed a High Fat Diet. **Japanese Journal of Physiology**, 42: 673-680, 1992.

ZHAO, B; WALL, R.J. E YANG, J. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 337: 248-255, 2005.

ZIERATH JR, HOUSEKNECHT KL, GNUDI L, KAHN B. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. **Diabetes** 46: 215-223, 1997.

ZIMMERS T.A. et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science** **296**: 1486-1488, 2002.