



# Exercício Físico Reduz a Hiperglicemia de Jejum em Camundongos Diabéticos Através da Ativação da AMPK

## Physical Exercise Decreases Fasting Hyperglycemia in Diabetic Mice Through AMPK Activation

Mônica F. de Pádua\*

Thomas F. de Pádua\*

José R. Pauli

Cláudio T. de Souza

Adelino S. R. da Silva

Eloize C. C. Ropelle

Dennys E. Cintra

José Barreto C. Carvalheira

Eduardo R. Ropelle

\*Contribuíram igualmente para a realização deste artigo.

Departamento de Clínica Médica –  
FCM – Universidade de Estadual de  
Campinas (Unicamp) – Campinas,  
SP, Brasil.

### Endereço para correspondência:

Prof. Eduardo R. Ropelle.

Departamento de Clínica Médica,  
Faculdade de Ciências Médicas  
(FCM), Universidade de Estadual de  
Campinas (Unicamp).  
13081-970 – Campinas, SP, Brasil  
Tel./fax: (19) 3521-8950.  
E-mail: ropelle@fcm.unicamp.br

Submetido em 01/02/2008

Versão final recebida em 03/07/2008

Aceito em 28/11/2008

### RESUMO

**Introdução:** A deficiência na captação de glicose em tecidos periféricos e o aumento da gliconeogênese hepática são fenômenos fisiopatológicos observados em pacientes diabéticos do tipo 2. O exercício físico é considerado um importante aliado para a melhora do perfil glicêmico em pacientes diabéticos; entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo não estão completamente elucidados. **Objetivo:** Avaliar o papel da proteína AMPK no controle glicêmico em camundongos diabéticos após o exercício físico. **Métodos:** Durante o jejum, o teste de tolerância à insulina (ITT) e a técnica de *Western blot* foram combinados para avaliar a homeostase da glicose em camundongos diabéticos (*ob/ob* e *db/db*) submetidos a uma única sessão de natação. **Resultados:** A hiperglicemia de jejum, a severa resistência à insulina e a deficiência na sinalização da via AMPK/ACC no músculo e no fígado observadas nos camundongos diabéticos foram revertidas após a sessão de exercício. A restauração da via AMPK/ACC reduziu a expressão da enzima gliconeogênica PEPCK no fígado e aumentou a translocação do GLUT4 no músculo esquelético. Esses dados apontam que a ativação da via AMPK/ACC induzida pelo exercício físico é importante para a redução da glicemia de jejum em modelos experimentais de diabetes tipo 2. Esses dados abrem novas frentes para o entendimento de como a atividade física controla a homeostase da glicose em pacientes diabéticos.

**Palavras-chave:** exercício agudo, diabetes tipo 2, *ob/ob*, *db/db*, músculo, fígado.

### ABSTRACT

**Introduction:** The deficiency in glucose uptake in peripheral tissues and increased hepatic gluconeogenesis are physiopathological phenomena observed in type 2 diabetes patients. Physical exercise plays an important role in the improvement of glycemic profile in diabetic patients; however, the mechanisms involved in these processes have not been fully elucidated. **Objective:** to assess the role of AMPK protein in the glycemic control of diabetic mice after exercise. **Methods:** During fasting condition, the insulin tolerance test (ITT) and Western blot technique, were combined to assess the glucose homeostasis in diabetic mice (*ob/ob* and *db/db*) after a single swimming session. **Results:** Fasting hyperglycemia, severe insulin resistance and deficiency in the AMPK/ACC signaling in muscle and liver observed in the diabetic mice were reversed after the exercise session. The restoration of AMPK/ACC signaling reduced the expression of the gluconeogenic enzyme, PEPCK in the liver, and increased the translocation of GLUT4 in the skeletal muscle. These data indicate that the activation of AMPK/ACC pathway induced by physical exercise is important to reduce fasting glucose levels in experimental models of type 2 diabetes. These data open new insights for determination of physical activity control on the glucose homeostasis in diabetic patients.

**Keywords:** acute exercise, type 2 diabetes, *ob/ob*, *db/db*, muscle and liver.

### INTRODUÇÃO

O diabetes tipo 2 é o resultado de uma complexa inter-relação entre componentes genéticos e ambientais. Indivíduos com diabetes do tipo 2 apresentam hiperglicemia de jejum devido ao elevado e constante programa de gliconeogênese hepática e baixa capacidade de captação e utilização da glicose no músculo esquelético. Evidências<sup>(1,2)</sup> apontam que a prática da atividade física melhora a homeostase da glicose em seres humanos e em roedores com resistência à insulina<sup>(3-5)</sup>. A melhora da captação de glicose no músculo e a diminuição da produção hepática de glicose após o exercício físico ocorrem através

de diversas vias de sinalização intracelulares; dentre elas se destacam a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K) e a via da proteína quinase ativada por AMP, a AMPK<sup>(6-7)</sup>.

A AMPK é uma enzima importante para a manutenção energética intracelular, especificamente durante situações de estresse, como o exercício físico ou privação alimentar. A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$ <sup>(8)</sup>. Essa proteína é ativada pela fosforilação do resíduo<sup>(8-9)</sup> de treonina 172 da alça de ativação da subunidade  $\alpha$  causada principalmente pelo decréscimo do *status energético celular*<sup>(10)</sup>. Uma vez fosforilada, a AMPK induz a fosforilação e inibe a atividade

da acetil CoA carboxilase, a ACC. Evidências sugerem que essa via de sinalização participa de eventos metabólicos importantes como: a lipólise (adiposo), metabolismo de lipídios (fígado e músculo), transporte de glicose (músculo e adiposo) e metabolismo de glicogênio (músculo e fígado)<sup>(6)</sup>.

Diferentes autores reportaram que a ativação da AMPK induzida pela contração muscular está envolvida com a captação de glicose em modelos experimentais e em seres humanos, através do aumento da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular<sup>(3,11)</sup>. Além disso, a ativação da via AMPK/ACC através de agentes farmacológicos como a metformina mostrou-se determinante para a diminuição da produção hepática de glicose, através da modulação da expressão de enzimas gliconeogênicas como a glicose-6-fosfatase (G6Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK)<sup>(12)</sup>. Tanto a captação de glicose como a supressão do programa gliconeogênico mediado pela atividade da AMPK ocorrem de maneira independente da transmissão do sinal da insulina. Dessa forma, a ativação da via AMPK/ACC em estado de resistência à insulina e/ou de *diabetes mellitus* tem ganhado destaque nos últimos anos. No entanto, os mecanismos intracelulares pelos quais a atividade física melhora o perfil glicêmico em pacientes diabéticos permanecem apenas parcialmente conhecidos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de uma única sessão de exercício físico sobre a via de sinalização intracelular AMPK/ACC no músculo e no fígado de camundongos diabéticos, identificando a importância dessa via de sinalização para o controle da glicemia de jejum em dois modelos experimentais de diabetes tipo 2.

## MÉTODOS

### Animais experimentais e protocolos de pesquisa

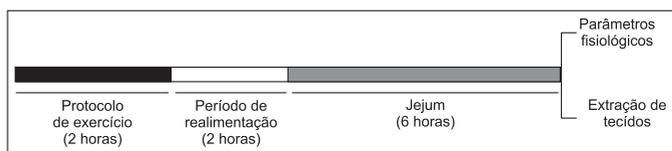
Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos descritos pelas *National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals* e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas. Camundongos machos da linhagem C57 Bl/6 magros e animais diabéticos (com deficiência na produção de leptina *ob/ob+/+* e com deficiência do receptor de leptina *db/db+/+*), foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada de 22°C a 24°C e com ciclos de luz artificial (12 horas claro e 12 horas escuro). Os animais tiveram livre acesso a dieta padrão e a água.

### Protocolo de exercício físico

O protocolo de natação de intensidade leve foi adaptado do protocolo publicado por Oh *et al.*<sup>(13)</sup>. Os camundongos nadaram em recipientes plásticos com 40cm de comprimento, 25cm de largura e 20cm de profundidade sem adição de sobrecarga. A temperatura da água foi mantida entre 32°C e 33°C. Antes do início do protocolo, os animais foram adaptados ao meio líquido nadando 10 minutos durante três dias consecutivos. Após o período de adaptação, os animais controle, *ob/ob+/+* e *db/db+/+* foram selecionados aleatoriamente e submetidos individualmente a uma única sessão de exercício, que consistiu em duas horas ininterruptas de natação. Após o término do protocolo, todos os animais tiveram livre acesso à água e ração durante o período de duas horas; em seguida, todos os animais foram submetidos a um período de jejum de seis horas, conforme demonstra a figura 1.

### Parâmetros fisiológicos e teste de tolerância à insulina (ITT)

Após o período de jejum, todos os animais foram pesados e o tecido adiposo epididimal foi cuidadosamente dissecado e pesado em balança analítica. Níveis sanguíneos de glicose foram determinados utilizando glicosímetro (*Advantage Boehringer Mannheim*, EUA).



**Figura 1.** Desenho experimental. Os camundongos normais e diabéticos *ob/ob* e *db/db* foram submetidos a uma sessão de natação sem sobrecarga durante duas horas. Ao término do protocolo de exercício, todos os animais, inclusive os animais magros (controle), tiveram livre acesso à água e ração e posteriormente ficaram em jejum de seis horas. Após o período de jejum, foram avaliados os parâmetros fisiológicos e amostras de músculo e fígado foram extraídas para análise por *Western blot*.

Seis animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização do teste de tolerância à insulina. O teste foi realizado após jejum de 6h; a primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0. Em seguida, a insulina (2U/kg de peso corporal) foi injetada no peritônio dos camundongos e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante da remoção da glicose (*Kitt*) foi calculada usando a fórmula  $0,693/t_{1/2}$ . O  $t_{1/2}$  da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

### Extração dos tecidos

Os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico (4mg/100g de peso corporal) e para controle de anestesia foram observados os reflexos pedal e de córnea antes de qualquer procedimento experimental. Após o término dos reflexos, amostras de fígado e do gastrocnêmio foram extraídas e homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de ortovanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado de cada amostra foi então centrifugado a 11.000rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford<sup>(14)</sup>. Em seguida, o tampão de Laemmli foi acrescido a cada uma das amostras que posteriormente foram fervidas por cinco minutos e armazenadas a -80°C para futura análise por *Western blot*.

### Determinação do GLUT4 na membrana plasmática

Para caracterizar expressão e a localização subcelular do GLUT4, utilizamos a metodologia previamente descrita<sup>(15)</sup>. Fragmentos do músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em tampão de STE (0,32M sucrose, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 2mM EDTA, 1mM DTT, 100mM fluoreto de sódio, 100mM pirofosfato de sódio, 10mM ortovanadato de sódio, 1mM PMSF e 0,1mg aprotinina/ml a 4°C. As amostras foram centrifugadas (1.000 × g, 25 min, 4°C) para obtenção dos *pellets*. Os *pellets* foram lavados com tampão de STE, novamente centrifugados (1.000 × g, 10 min, 4°C) e ressuspensos em tampão contendo Triton (1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 200mM EDTA, 10mM ortovanadato de sódio, 1mM PMSF, 100mM NaF, 100mM pirofosfato de sódio e 0,1mg aprotinina/ml), mantidos no gelo por 30 min e centrifugados (15.000 × g, 30 min, 4°C) para a obtenção da fração nuclear. O sobrenadante foi centrifugado a (100.000 × g, 60 min, 4°C) para a obtenção da fração citosólica e o *pellet*, ressuspensão em tampão de STE 1% NP-40, mantidos no gelo por 20 min e centrifugado a (100.000 × g, 20 min) para a obtenção da fração membranar. As frações foram tratadas com tampão de Laemmli com 100mM de DTT e fervidas em água por 5 min; as alíquotas (100µg de proteína) foram submetidas a análise através da técnica de *Western blot*, com utilização do anticorpo anti-GLUT4, como foi previamente descrito<sup>(16)</sup>.

## Immunoblotting

Amostras de fígado e músculo dos grupos avaliados foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante 12 horas com anticorpos específicos. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/L de Tris; 150mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 1,5 hora. O sinal foi detectado por tratamento com  $2\mu\text{Ci}$  de  $[^{125}\text{I}]$  proteína A ( $30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) em 10mL de tampão de bloqueio por duas horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak a  $-80^\circ\text{C}$  de 12-48 horas. As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica através do programa Scion Image.

## Anticorpos e reagentes

Os anticorpos, anti-AMPK, antifosfoAMPKThr172, anti-ACC, antifosfoACC Ser 79 e anti-PEPCK foram obtidos da *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA). Os anticorpos anti-GLUT4 e anti- $\alpha$ -Tubulina foram obtidos da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA). Os reagentes de rotina utilizados foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO).

## Análise estatística

Para análise estatística, utilizamos o *software Instat* (versão 3.0). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) two-way para comparação entre os grupos. O teste de Bonferroni foi empregado para análise de múltipla comparação *post-hoc*, quando necessário. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, empregando o nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Caracterização fisiológica e metabólica

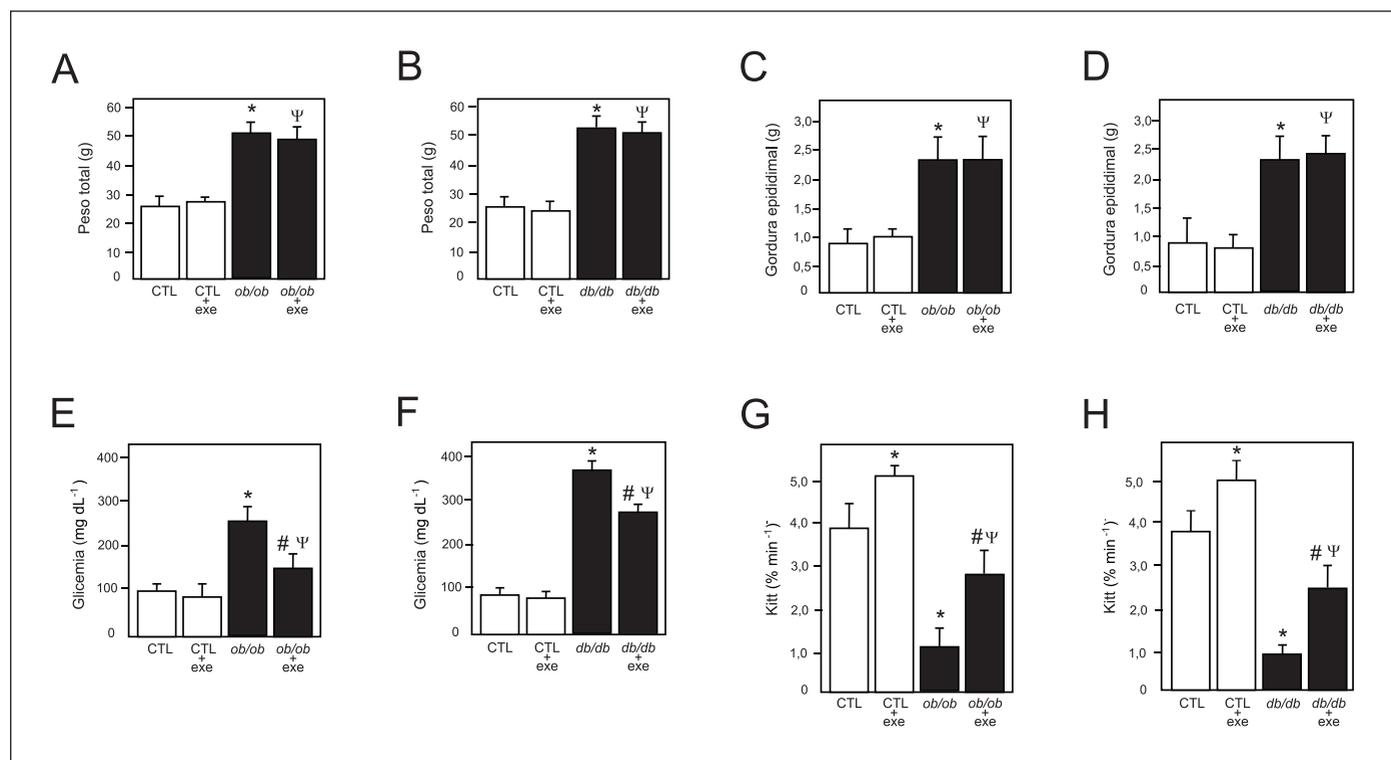
A figura 2 mostra os dados relativos ao peso corporal, gordura epididimal, glicemia de jejum e a taxa de remoção da glicose (*Kitt*) de camundongos magros (CTL), controle exercitado (CTL+exe), diabéticos em repouso (*ob/ob* e *db/db*) e diabéticos submetidos ao protocolo de exercício (*ob/ob+exe* e *db/db+exe*). Os animais *ob/ob* e *db/db* que ficaram em repouso ou que foram submetidos ao protocolo de exercício apresentaram peso corporal total (figuras 2A e B), quantidade de gordura epididimal (figuras 2C e D), glicemia de jejum (figuras 2E e F) e resistência à insulina (figuras 2G e H) significativamente maiores quando comparados com os respectivos grupos controle. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o peso corporal e a gordura epididimal dos grupos exercitados quando comparado com os respectivos grupos controle (figuras 2A-D).

Oito horas após a sessão de exercício, observamos redução da glicemia de jejum apenas nos animais diabéticos exercitados quando comparados com os animais *ob/ob* e *db/db* que permaneceram em repouso (figuras 2E e F). O teste de tolerância à insulina revelou que a sessão aguda de exercício aumentou a sensibilidade à insulina nos animais controle e reverteu parcialmente a severa resistência à insulina encontrada nos grupos *ob/ob* e *db/db* não exercitados (figuras 2G e H).

### O exercício físico aumenta a atividade da via AMPK/ACC e reduz a expressão de PEPCK no fígado de camundongos diabéticos

A figura 3 demonstra a fosforilação da AMPK e da ACC no tecido hepático de camundongos magros (CTL), controle exercitado (CTL+exe), diabéticos em repouso (*ob/ob* e *db/db*) e diabéticos submetidos ao protocolo de exercício (*ob/ob+exe* e *db/db+exe*).

Amostras de fígado foram removidas dos grupos estudados após seis horas de jejum. Os extratos dos fígados obtidos foram incubados com anticorpos antifosfoAMPK anti-AMPK, antifosfoACC e anti-ACC.



**Figura 2.** Caracterização fisiológica e metabólica dos camundongos magros (controle), diabéticos em repouso (*ob/ob* e *db/db*) e diabéticos submetidos ao protocolo de exercício (*ob/ob+exe* e *db/db+exe*). As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$  animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , versus o grupo controle em repouso,  $\Psi p < 0,05$ , versus o grupo magro exercitado e #  $p < 0,05$ , versus o grupo diabético não exercitado.

As figuras 3A e 3B demonstram que o exercício aumentou a fosforilação da AMPK em 119,3% (3A) e 163% (3B) nos animais magros quando comparado com os respectivos grupos controle que ficaram em repouso. A fosforilação da ACC manteve o mesmo perfil, aumentando em 226% (3C) e 282,1% (3D) nos animais magros quando comparado com os respectivos grupos controle que ficaram em repouso. Durante o período de jejum observamos redução significativa da atividade da via de sinalização AMPK/ACC no fígado dos camundongos diabéticos, reduzindo a fosforilação da AMPK em 54,8% e 36% e a fosforilação da ACC em 65,5% e 68,8% no tecido hepático dos camundongos diabéticos *ob/ob* e *db/db*, respectivamente, quando comparados com os respectivos animais controle em repouso (figuras 3A-D). O exercício físico restaurou a atividade dessa via de sinalização no fígado dos camundongos diabéticos, aumentando a fosforilação da AMPK em 235% e 179,5% e a fosforilação da ACC em 342,1% e 392,2% nos grupos *ob/ob+exe* e *db/db+exe* quando comparados com os grupos diabéticos *ob/ob* e *db/db*, respectivamente (figuras 3A-D). Não observamos diferença na quantidade total das proteínas AMPK e ACC nesse tecido entre os grupos estudados (figuras 3A-D, painéis inferiores).

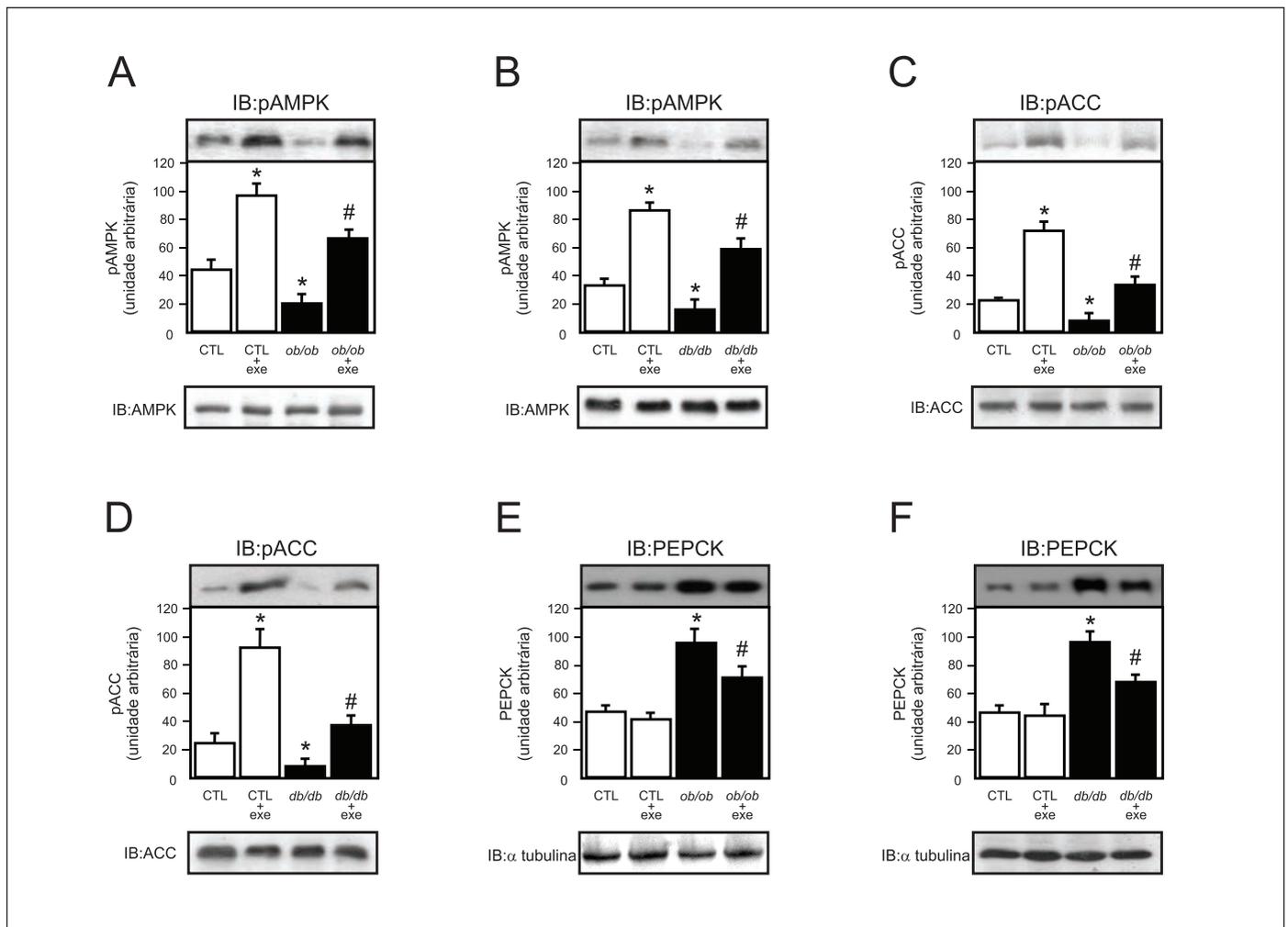
As figuras 3E e 3F apresentam os dados relativos à expressão da enzima gliconeogênica, PEPCK, no fígado dos grupos controle, controle exercitado, *ob/ob* e *db/db* em repouso e dos grupos *ob/ob* e *db/db* submetidos ao protocolo de exercício.

Não observamos diferença na expressão da PEPCK no fígado dos animais controle em repouso quando comparados com os animais controle exercitados. No entanto, expressão de PEPCK é maior nos animais *ob/ob* (105,5%) e *db/db* (106%) quando comparados com os respectivos animais controles magros. Os grupos *ob/ob* e *db/db* que realizaram exercício obtiveram decréscimo da expressão de PEPCK da ordem de 26,2 e 29,6%, respectivamente, em relação aos grupos diabéticos que permaneceram em repouso (figuras 3E e F).

### O exercício físico aumenta a atividade da via AMPK/ACC e a expressão de GLUT4 na membrana plasmática no músculo de camundongos diabéticos

A figura 4 demonstra a fosforilação da AMPK e da ACC no músculo gastrocnêmio de camundongos magros (CTL), controle exercitado (CTL+exe), diabéticos em repouso (*ob/ob* e *db/db*) e diabéticos submetidos ao exercício (*ob/ob+exe* e *db/db+exe*). Os tecidos musculares foram removidos dos grupos estudados após seis horas de jejum.

Nos animais controle após o protocolo de exercício, observamos aumento da fosforilação da AMPK de 228% (figura A) e de 228% (figura B) e aumento da fosforilação da ACC de 105,2% (figura A) e de 166,3% (figura B), quando comparados com os respectivos animais controle. Além disso, observamos redução de 55,2% e de 38,5% na fosforilação da AMPK e de 50% e de 47,4% na fosforilação da ACC no tecido muscular dos camundongos *ob/ob* e *db/db*,



**Figura 3.** Exercício físico modula a atividade da via AMPK/ACC no fígado de camundongos diabéticos. **A e B)** Western blot representativo da AMPK fosforilada (painéis superiores) a quantidade total da AMPK (painéis inferiores). **C e D)** Western blot representativo da ACC fosforilada (painéis superiores) a quantidade total da ACC (painéis inferiores). **D e E)** Western blot representativo da expressão de PEPCK. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$  animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , versus o grupo controle em repouso e #  $p < 0,05$ , versus o grupo diabético não exercitado.

respectivamente, quando comparados com os respectivos animais controles (figuras 4A-D). Oito horas após uma única sessão de exercício, a atividade da via de sinalização AMPK/ACC foi restaurada no músculo gastrocnêmio dos camundongos diabéticos, aumentando a fosforilação da AMPK em 229,4% e 288,5% e a fosforilação da ACC em 194,5% e 381,4% nos grupos *ob/ob+exe* e *db/db+exe* quando comparados com os grupos diabéticos *ob/ob* e *db/db*, respectivamente (figuras 4A-D). Não observamos diferença na quantidade total das proteínas AMPK e ACC entre os grupos estudados (figuras 4A-D, painéis inferiores).

As figuras 4E e 4F apresentam os dados relativos à expressão de GLUT4 na membrana plasmática no tecido muscular dos grupos controle, controle exercitado, *ob/ob* e *db/db* em repouso e dos grupos *ob/ob* e *db/db* submetidos ao protocolo de exercício.

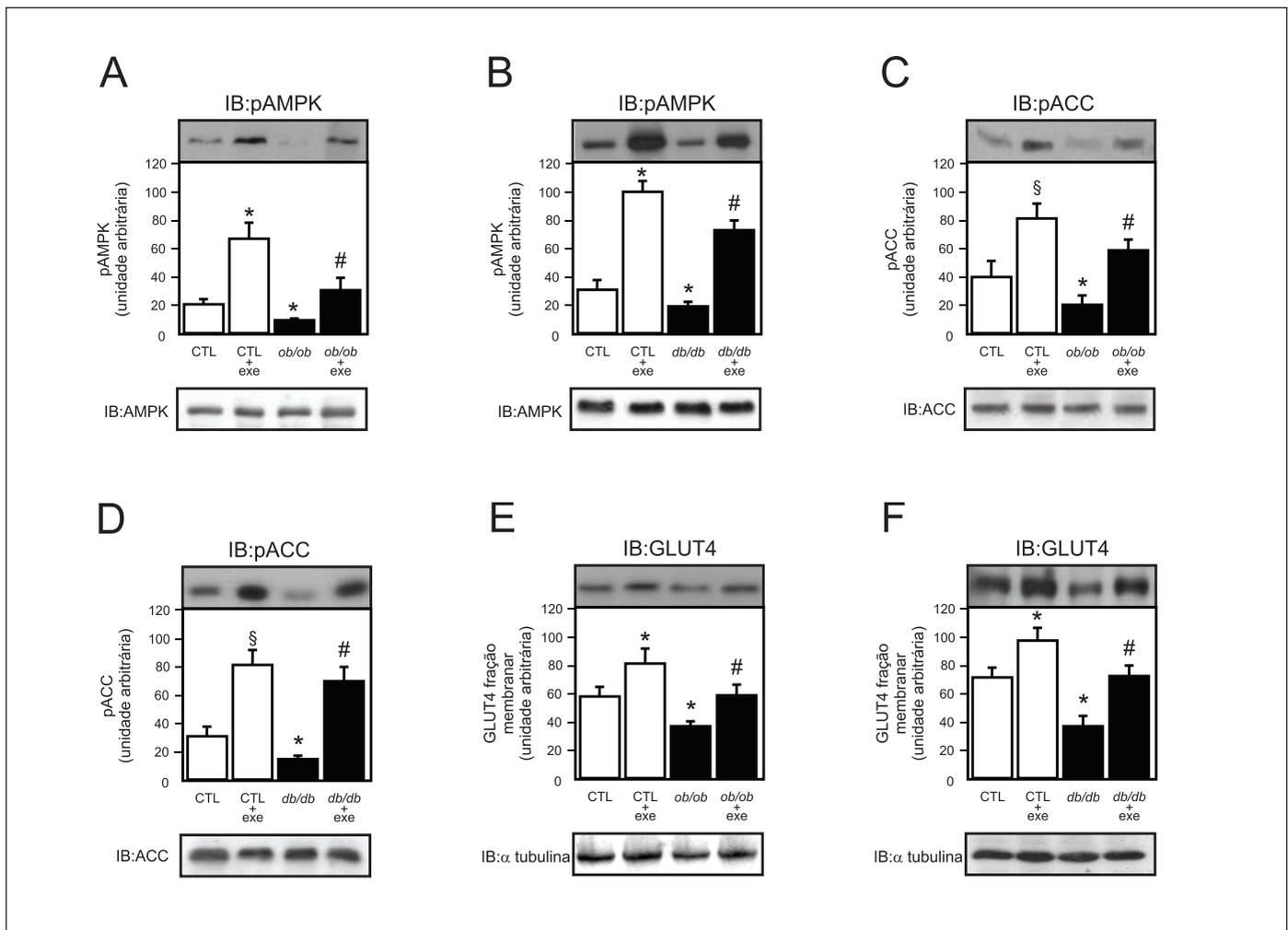
Nos animais controle após o protocolo de exercício, observamos aumento da expressão de GLUT4 na membrana plasmática na ordem de 40,7% (figura 4E) e de 36,8% (figura 4F), quando comparados com os respectivos animais controle. No entanto, a expressão de GLUT4 foi menor nos animais *ob/ob* (37%) e *db/db* (48,8%) quando comparados com os respectivos grupos controle em repouso. Os grupos *ob/ob* e *db/db* que realizaram exercício obtiveram aumento da expressão de GLUT4 na membrana da ordem de 90,7 e 84,2%, respectivamente, em relação aos grupos diabéticos que permaneceram em repouso (figuras 4E e F).

## DISCUSSÃO

A glicemia de jejum é um dos parâmetros mais importantes para o diagnóstico do *diabetes mellitus*. A falha na captação de glicose através do músculo esquelético e o aumento da produção hepática de glicose são dois fatores determinantes para o aparecimento da hiperglicemia de jejum em pacientes com diabetes tipo 2<sup>(17)</sup>. O presente estudo demonstrou que uma única sessão de exercício físico reduziu a hiperglicemia de jejum em dois modelos de camundongos diabéticos. Esses efeitos ocorreram em paralelo com a restauração da via de sinalização AMPK/ACC no músculo e no fígado de camundongos *ob/ob* e *db/db*.

O exercício físico é uma ferramenta importante para o controle da glicemia em pacientes com diabetes. No entanto, os mecanismos pelos quais a atividade física melhora o perfil glicêmico nesses pacientes são intensamente pesquisados, porém, apenas parcialmente conhecidos. Alguns autores acreditam que a redução da glicemia em pacientes com diabetes seja decorrente da perda de peso induzida pelo aumento do gasto energético promovido pelo exercício<sup>(18-19)</sup>. Nossos dados sugerem que o controle da homeostase da glicose pode ocorrer de maneira independente da perda de peso total ou da perda de gordura corporal, como demonstrado na figura 2.

Múltiplas vias de sinalizações intracelulares estão envolvidas com a captação de glicose e no controle da gliconeogênese. Nos últimos anos, a AMPK vem ganhando destaque como uma enzima-chave no controle de diversos eventos fisiológicos, incluindo a modulação da



**Figura 4.** Exercício físico modula a atividade da via AMPK/ACC no músculo de camundongos diabéticos. **A e B)** *Western blot* representativo da AMPK fosforilada (painéis superiores) e quantidade total da AMPK (painéis inferiores). **C e D)** *Western blot* representativo da ACC fosforilada (painéis superiores) e quantidade total da ACC (painéis inferiores). **D e E)** *Western blot* representativo da expressão do GLUT4 na membrana plasmática. As barras representam as médias  $\pm$  erro padrão,  $n = 6$  animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , versus o grupo controle em repouso e #  $p < 0,05$ , versus o grupo diabético não exercitado.

homeostase da glicose. Além do metabolismo da glicose em diversos tecidos, a via de sinalização AMPK/ACC está envolvida diretamente no controle da ingestão alimentar através de ações no sistema nervoso central<sup>(20-22)</sup>, no metabolismo de lipídios<sup>(23)</sup>, no processo anti-inflamatório<sup>(24)</sup>, dentre outros. Recentemente, estudos reportaram que roedores alimentados com uma dieta rica em gordura apresentam redução na fosforilação da AMPK no músculo esquelético<sup>(7)</sup>, tecido hipotalâmico<sup>(25)</sup> e no fígado<sup>(26)</sup>. Em meio a esse cenário, pesquisadores verificaram, em modelos animais e em seres humanos com diabetes tipo 2, que o tratamento com diferentes ativadores farmacológicos da AMPK, como AICAR e a metformina, promovem aumento da captação de glicose pelo músculo, redução do programa de gliconeogênese hepático e recuperação da sensibilidade à insulina<sup>(27)</sup>. Além da ativação da AMPK por agentes farmacológicos, prévios estudos determinaram que o exercício físico também é capaz de aumentar a atividade da AMPK no tecido muscular em seres humanos saudáveis e diabéticos<sup>(12,28)</sup>; no entanto, os efeitos do exercício físico sobre a atividade da AMPK no tecido hepático são pouco explorados.

Nossos resultados demonstraram que a atividade da via AMPK/ACC estava reduzida no músculo e no fígado dos camundongos *ob/ob* e *db/db*, de maneira que uma única sessão de exercício físico foi capaz de restaurar a fosforilação da AMPK e da ACC em ambos os tecidos. O aumento da atividade dessa via no fígado e no músculo foi responsável por reduzir a expressão de PEPCK no tecido hepático e

aumentar a expressão de GLUT4 na membrana celular. É importante destacar que no presente estudo utilizamos um protocolo de exercício aeróbico de baixa intensidade e que possivelmente exercícios de alta intensidade também possam ativar esses mecanismos, aumentando principalmente a translocação do GLUT4 até a membrana celular no músculo esquelético, uma vez que sabidamente esse fenômeno está diretamente ligado à intensidade do exercício, inclusive em pacientes com diabetes tipo 2<sup>(5)</sup>. Dessa forma, esses dados apontam que o aumento da fosforilação da AMPK induzida pelo exercício físico pode reduzir a produção de glicose hepática e aumentar a captação de glicose no músculo em dois modelos de animais com diabetes tipo 2. Coletivamente, esses resultados sugerem que a ativação da via de sinalização AMPK/ACC induzida pelo exercício representa um potencial alvo terapêutico para o controle da homeostase da glicose em pacientes com diabetes tipo 2.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Srs. Luiz Janeri, Jósimo Pinheiro e Márcio A. da Cruz pelo apoio técnico. Este estudo contou com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999;48:1198-214.
- Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* 2006;116:1767-75.
- Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho Filho MA, Moraes JC, de Souza CT, et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein Kinase B/Akt in dietary induced obese Wistar rats. *J Physiol* 2007;586:659-71.
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol* 2006;577:997-1007.
- Sriwijitkamol A, Coletta DK, Wajsborg E, Balbontin GB, Reyna SM, Barrientes J, et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes* 2007;56:836-48.
- Barnes BR, Zierath JR. Role of AMP-activated protein kinase in the control of glucose homeostasis. *Curr Mol Med* 2005;5:341-8.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005;1:15-25.
- Hardie DG. Mini-review: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003;144:5179-83.
- Carling D. Ampk. *Curr Biol* 2004;14:R220.
- Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase - fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 1997;246:259-73.
- Winder WW, Thomson DM. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys* 2007;47:332-47.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005;310:1642-6.
- Oh KS, Kim EY, Yoon M, Lee CM. Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. *Exp Mol Med* 2007;39:385-34.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Mizukami Y, Yoshida K. Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. *Biochem J* 1997;323(Pt 3):785-90.
- Prada PO, Pauli JR, Ropelle ER, Zecchin HG, Carvalheira JB, Velloso LA, et al. Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. *FEBS Lett* 2006;580:4889-94.
- Bailey CJ. Treating insulin resistance in type 2 diabetes with metformin and thiazolidinediones. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:675-91.
- Haffner SM. Can reducing peaks prevent type 2 diabetes: implication from recent diabetes prevention trials. *Int J Clin Pract Suppl* 2002:33-9.
- Scheen AJ. Aggressive weight reduction treatment in the management of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 1998;24:116-23.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569-74.
- Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MF, Rocco SA, Marin RM, Morari J, et al. A central role for neuronal AMPK and mTOR in high protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 2007.
- Ropelle ER, Pauli JR, Zecchin KG, Ueno M, de Souza CT, Morari J, et al. A central role for neuronal adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. *Endocrinology* 2007;148:5220-9.
- Daval M, Foufelle F, Ferre P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 2006;574:55-62.
- Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 2004;24:479-87.
- Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 2006;281:18933-41.
- Zhang H, Chen X, Aravindakshan J, Sairam MR. Changes in adiponectin and inflammatory genes in response to hormonal imbalances in female mice and exacerbation of depot selective visceral adiposity by high-fat diet: implications for insulin resistance. *Endocrinology* 2007;148:5667-79.
- Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E677-84.
- Birk JB, Wojtaszewski JF. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2006;577:1021-32.