



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO



# EFEITO TERAPÊUTICO DO TREINAMENTO FÍSICO NA SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM RATOS

MARIA ANDRÉA BARBOSA

Ouro Preto, MG

2016

MARIA ANDRÉA BARBOSA

EFEITO TERAPÊUTICO DO TREINAMENTO  
FÍSICO NA SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA  
POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM RATOS

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Carvalho Alzamora

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Guerra de Sá Cota

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição, área de concentração Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

B238e      Barbosa, Maria Andréa.  
Efeito terapêutico do treinamento físico na síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos [manuscrito] / Maria Andréa Barbosa. - 2016.  
75f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.  
Coorientador: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .  
Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Síndrome metabólica. 2. Treinamento físico. 3. Tecidos adiposos branco e marrom. 4. Via de sinalização da insulina. 5. Adipocinas. I. Alzamora, Andréia Carvalho. II. Cota, Renata Guerra de Sá . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 613.2



UFOP

Universidade Federal  
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
**Escola de Nutrição – ENUT**  
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



**ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aos quatro dias do mês de março de dois mil e dezesseis, às dez horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Maria Andréa Barbosa**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelas Professoras Daniela Caldeira Costa (UFOP), Dênia Antunes Saúde Guimarães (UFOP) e Andréia Carvalho Alzamora (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“Efeito terapêutico do treinamento físico na síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR

Profa. Dênia Antunes Saúde Guimarães (UFOP),  
Examinadora Externa.

Profa. Daniela Caldeira Costa (UFOP),  
Examinadora Interna.

Profa. Andréia Carvalho Alzamora (UFOP),  
Orientadora.

Maria Andréa Barbosa,  
Mestranda.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, REDE TOXIFAR, INCT-FAPEMIG-CNPQ, PRONEX-FAPEMIG, PROPP-NUPEB-UFOP.

“A verdadeira coragem não é a de enfrentar o leão, a cobra, mas sim, a de enfrentar o nosso próprio impulso.”

CHICO XAVIER

Dedico este trabalho a Deus e aos meus familiares

## **AGRADECIMENTOS**

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Carvalho Alzamora, minha orientadora, por ter me acolhido no laboratório em um momento muito difícil em minha vida quando estava muito fragilizada e com várias portas se fechando para mim. Iniciei meu trabalho como técnica e a cada tarefa que era compartilhada com todos no laboratório fui me refazendo. Muito obrigada por me ensinar a pensar melhor.

A minha coorientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Guerra de Sá Cota, por me ensinar as técnicas e emprestar equipamentos e materiais para realização dos experimentos.

À minha família, meu bem mais precioso, minha fortaleza! Meu pai Joaquim, minha mãe Nélia, minhas irmãs Lira, Fá, Adelma e Diane obrigada pelas orações. Por compartilhar comigo as aflições de cada etapa. Por compreender as ausências. Hoje estou aqui porque vocês me auxiliaram e me mantiveram em pé. Muito obrigada pelo apoio, pelo carinho que tiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório:

Diane, minha irmãzinha, me apresentou a prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Carvalho Alzamora;

Uberdan que foi idealizador desse trabalho junto com a prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Carvalho Alzamora e ainda pela ajuda na montagem e treinamento para as apresentações;

Grazi minha maior incentivadora;

Aline minha companheira de experimentos no período de férias;

Isadora e Taynara pelo auxílio nos experimentos;

Luiz pela boa convivência;

Gabi e Milla pelo auxílio no computador.

A Karina, que mesmo depois de ter concluído seu trabalho no laboratório continuou me auxiliando com muito boa vontade.



Wânia, minha amiga, que sempre me apoiou, que ouviu meus desabafos nos momentos de indecisão quanto aos experimentos.

Às minhas ex-colegas de trabalho:

Shirlei pela liberação de algumas horas do dia para participar das atividades do laboratório quando eu era funcionária do restaurante;

Judith pelo apoio, estímulo e ajuda nas atividades quando estava ausente do restaurante;

Rose pelo trabalho no restaurante, sempre me substituindo com muito profissionalismo e amizade.

À Milledede pelo auxílio na formatação da dissertação.

Aos meus amigos da Casa Espírita Chico Xavier principalmente Hellen pela torcida, pelas preces, pelos diálogos.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Caldeira Costa pela participação nas minhas bancas, auxílio para aprimoramento do trabalho e pelo entusiasmo que desperta em mim o desejo de estudar cada vez mais.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dênia Antunes Saúde Guimarães pela participação na banca e auxílio com os equipamentos.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria José Campagnole e ao Prof. Dr. Robson Santos pelos recursos financeiros e materiais para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos animais dos experimentos que sacrificam suas vidas pela ciência.

À CAPES, REDE TOXIFAR, INCT-FAPEMIG-CNPQ, PROPP-NUPEB-UFOP pelo financiamento.

## RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela coexistência de alterações metabólicas como acúmulo de tecido adiposo branco visceral, resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão arterial, disfunção endotelial e estado pró-inflamatório. O treinamento físico (TF) tem sido reconhecido por prevenir o desenvolvimento da SM por reduzir o tecido adiposo branco e aumentar os depósitos de tecido adiposo marrom (TAM), a sensibilidade periférica à insulina e o gasto energético. Porém, poucos estudos têm descrito a respeito da eficiência do TF no tratamento da SM. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito terapêutico do TF sobre os parâmetros bioquímicos, expressão de adipocinas e sinalização da insulina no tecido adiposo retroperitoneal e no TAM, além de avaliar a expressão gênica das proteínas desacopladoras (UCPs) no músculo gastrocnêmico e no tecido adiposo em ratos com SM induzida pela dieta hiperlipídica. Ratos com 4 semanas de idade foram alimentados com dieta controle AIN-93 ou dieta hiperlipídica por 13 semanas e submetidos ao TF por seis semanas, a partir da sétima semana de dieta, o TF consistia em natação com carga de até 2,5% do peso corporal. A temperatura corporal e a ingesta alimentar foram quantificados semanalmente. A avaliação indireta da pressão arterial média (PAM) através de pletismografia de cauda foi realizada ao final da 6ª e 13ª semana. No final da 13ª semana foi avaliado também a cinética do lactato sanguíneo (kit comercial), os parâmetros bioquímicos em soro e plasma usando kits comerciais e as expressões de mRNA (qRT-PCR) foram avaliadas no tecido adiposo retroperitoneal, no BAT e no músculo gastrocnêmico. Os animais SM-SED ( $17.1 \pm 0.8$  mmol/L; n=6) apresentaram níveis de lactato maior comparados ao grupo CT-SED ( $9.7 \pm 1.0$  mmol/L; n=6). O grupo SM-TF ( $8.9 \pm 0.58$  n=6) apresentou redução comparada ao grupo SM-SED e similar ao grupo CT-SED. Não foi observado diferença entre os grupos (CT-SED e SM-SED). Os animais do grupo SM-TF apresentaram aumento da temperatura corporal cinco minutos antes do TF e redução cinco minutos após o TF na 11ª e 12ª quando comparados ao grupo CT-TF. Já, na 13ª semana o grupo SM-TF cinco minutos antes e após o TF o CT-TF cinco minutos após apresentaram

redução da temperatura corporal quando comparado ao grupo CT-TF cinco minutos antes do TF. Os animais dos grupos SM-SED e SM-TF apresentaram redução da ingesta alimentar comparados ao grupo CT-SED na 6<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana. Os animais dos grupos SM-SED e SM-TF apresentaram aumento da PAM e FC comparados ao grupo CT-SED na 6<sup>a</sup> semana. Já na 13<sup>a</sup> semana, os animais do grupo SM-SED apresentaram um aumento da pressão arterial e frequência cardíaca comparados ao grupo CT-SED. E, além disso, houve uma redução da PAM no grupo SM-TF comparado ao grupo SM-SED. Os animais SM-SED quando comparados ao grupo CT-SED, apresentaram aumento do peso corporal ( $316 \pm 9,6$  g vs  $286 \pm 6,3$  g), do índice de adiposidade ( $7.8 \pm 0.7$  vs  $4.4 \pm 0.2$ ), dos níveis plasmáticos (mmol/L) de glicose de jejum ( $6.95 \pm 0.11$  vs  $6.16 \pm 0.15$ ), do colesterol total ( $1.98 \pm 0.07$  vs  $1.76 \pm 0.04$ ). Os animais que foram submetidos à dieta hiperlipídica e ao TF quando comparados ao grupo SM-SED apresentaram diminuição do índice de adiposidade ( $4.4 \pm 0.2$  vs  $6.1 \pm 0.3$ ), do HOMA IR ( $9.1 \pm 1.8$  vs  $15.5 \pm 2.4$ ), da leptina ( $2.7 \pm 0.4$  vs  $17.9 \pm 5.9$ ), da resistina ( $1.7 \pm 0.8$  vs  $9.9 \pm 3.4$ ), da adipisina ( $7.7 \pm 0.8$  vs  $35.3 \pm 10.4$ ), do COX-2 ( $0.02 \pm 0.01$  vs  $0.13 \pm 0.04$ ) no tecido adiposo retroperitoneal e aumento do TAM ( $0.31 \pm 0.02$ g vs  $0.12 \pm 0.01$ g) e da UCP3 ( $3.55 \pm 1.37$  vs  $0.001 \pm 9.48$ ) no músculo gastrocnêmico. Nossos dados mostraram que o TF foi eficiente como tratamento por reverter diferentes alterações metabólicas e biométricas no tecido adiposo retroperitoneal e aumentar a atividade termogênica do TAM de ratos com SM já estabelecida induzida por dieta hiperlipídica.

Palavras chaves: síndrome metabólica, treinamento físico, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, adipocinas, via de sinalização da insulina.

## ABSTRACT

Metabolic Syndrome is characterized by the presence of metabolic disorders such as visceral white adipose tissue accumulation, insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, endothelial dysfunction and proinflammatory state. The physical training has been recognized for preventing the development of metabolic syndrome to reduce the white adipose tissue and increase deposits of brown adipose tissue, peripheral insulin sensitivity and energy expenditure. However, there are no data in the literature regarding physical training efficiency in the treatment of metabolic syndrome. The aim of this study was to evaluate the therapeutic effect of physical training on the biochemical parameters, adipokines expression and insulin signaling in retroperitoneal adipose tissue and the brown adipose tissue and to evaluate the gene expression of uncoupling proteins (UCPs) in the gastrocnemius muscle and adipose tissue in rats with metabolic syndrome induced by high fat diet. Rats with 4 weeks of age were fed with AIN-93 diet control or fat diet for 13 weeks and the physical training for six weeks from the seventh week of the diet, animals were swimming with loading up to 2.5% of body weight. The body temperature and food intake were measured semanalmente. The indirect measurement of mean arterial pressure by tail plethysmography was performed at the end of the 6th and 13th week. At the end of the 13th week was also evaluated the kinetics of blood lactate (commercial kit), biochemical parameters in serum and plasma using commercial kits and mRNA expression (qRT-PCR) were evaluated in the retroperitoneal adipose tissue, BAT and muscle gastrocnemius. SM-SED animals ( $17.1 \pm 0.8$  mmol/L;  $n = 6$ ) showed higher levels of lactate compared to CT-SED group ( $9.7 \pm 1.0$  mmol/L;  $n = 6$ ). The SM-TF group ( $8.9 \pm 0.58$   $n = 6$ ) showed a decrease compared to the SM-SED group and similar to CT-SED group. There was no difference between groups (CT-SED and SM-SED). Animals SM-TF group showed an increase in body temperature five minutes before physical training and reduced five minutes after the physical training, the 11th, 12th when compared to CT-TF group. Already, in the 13th week the SM-TF group five minutes before and after physical training and CT-TF five minutes after decreased body temperature hen compared to CT-TF group five minutes

before the physical training. Animal SM-SED and SM-TF groups showed reduced food intake compared to the CT-SED group in 6th, 9th and 12th week, respectively. The animals of the SM-SED and SM-TF groups showed an increase in mean arterial pressure and cardiac frequency compared to CT-SED group at 6 weeks. In the 13th week, the animals of the SM-SED group had an increase in blood pressure and heart rate compared to CT-SED group. And besides, there was a reduction in blood pressure in the SM-TF group compared to the SM-SED group. SM-SED animals when compared to CT-SED group showed an increase in body weight ( $316 \pm 9.6$  g vs.  $286 \pm 6.3$  g) of fat index ( $7.8 \pm 0.7$  vs  $4.4 \pm 0.2$ ) in plasma levels (mmol/L) fasting glucose ( $6.95 \pm 0.11$  vs  $6.16 \pm 0.15$ ), total cholesterol ( $1.98 \pm 0.07$  vs  $1.76 \pm 0.04$ ). The animals were subjected to high-fat diet and physical training compared to SM-SED group showed decreased adiposity index ( $4.4 \pm 0.2$  vs  $6.1 \pm 0.3$ ), HOMA IR ( $9.1 \pm 1.8$  vs  $15.5 \pm 2.4$ ), leptin ( $2.7 \pm 0.4$  vs  $17.9 \pm 5.9$ ) of resistin ( $1.7 \pm 0.8$  vs  $9.9 \pm 3.4$ ) of adiponin ( $7.7 \pm 0.8$  vs.  $35.3 \pm 10.4$ ), COX-2 ( $0.02 \pm 0.01$  vs  $0.13 \pm 0.04$ ) in the retroperitoneal adipose tissue and increased brown adipose tissue ( $0.31 \pm 0.02$  g vs  $0.12 \pm 0.01$  g) and UCP3 ( $3.55 \pm 1.37$  vs  $0.001 \pm 9.48$ ) in the gastrocnemius muscle. Our data showed that the physical training was effective as a treatment to reverse different metabolic and biometric changes in retroperitoneal adipose tissue and increase the thermogenic activity of brown adipose tissue rats with metabolic syndrome already established induced by high fat diet.

Key words: metabolic syndrome, physical training, white adipose tissue, brown adipose tissue, adipokines, insulin signaling pathway.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental.....	16
Figura 2: Composição das dietas consumidas.....	18
Figura 3: Programa de treinamento físico.....	19
Figura 4: Avaliação do lactato sanguíneo.....	28
Figura 5: Avaliação da temperatura corporal.....	29
Figura 6: Avaliação da ingesta alimentar.....	30
Figura 7: Avaliação da pressão arterial média e a frequência cardíaca.....	31
Figura 8: Expressão gênica da via de sinalização da insulina TAB.....	38
Figura 9: Expressão gênica das adipocinas pró-inflamatórias TAB.....	40
Figura 10: Expressão gênica da adiponectina e seu receptor 1 TAB.....	41
Figura 11: Expressão gênica da leptina, do TNF $\alpha$ e do PPAR $\gamma$ 2 TAM .....	43
Figura 12: Expressão gênica via de sinalização da insulina TAM.....	45
Figura 13: Expressão gênica PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , UCP1, UCP2 e UCP3 no músculo gastrocnêmico.....	47

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Parâmetros biométricos.....	33
Tabela 2: Parâmetros bioquímicos.....	35
Tabela 3: Resistência à insulina.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2R1C:** dois rins e um clipe

**°C:** graus celsius

**µL:** microlitros

**adipoR1:** receptor de adiponectina 1

**adipoR2:** receptor de adiponectina 2

**AG:** ácido graxo

**AKT:** proteína quinase B

**ALT:** alanina aminotransferase

**AMPK:** proteína quinase ativada por AMP

**ANOVA :** análise de variância

**AS160:** substrato de 60 KDa da AKT

**ASP:** proteína estimuladora de acilação

**AST:** aspartato aminotransferase

**ATP:** adenosina trifosfato

**CCA:** centro de ciência animal

**CMSPs:** células mononucleares da circulação periférica

**COX-2:** ciclooxigenase 2

**CT-SED:** animais submetidos à dieta controle e mantidos sedentários

**CT-TF:** animais submetidos à dieta controle e ao treinamento físico

**FC:** frequência cardíaca

**g:** grama

**GJ:** glicemia de jejum

**GLUT-4:** transportador de glicose do tipo 4

**HDL:** lipoproteína de alta densidade

**HOMA IR:** Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina



**HOMA  $\beta$** : Modelo de avaliação da homeostase da capacidade das células  $\beta$

**IJ**: insulinemia de jejum

**IL-1 $\beta$** : interleucina 1 beta

**IL-6**: interleucina 6

**IR**: receptor de insulina

**IRS-1**: substrato receptor de insulina 1

**IRS-2**: substrato receptor de insulina 2

**JNK**: quinase c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal

**kDa**: kilodalton

**LABNEX**: laboratório de nutrição experimental

**LAPAC**: laboratório piloto de análises clínicas

**LDL**: lipoproteína de baixa densidade

**LHS**: lipase hormônio sensível

**LPL**: lipase lipoprotéica

**M1**: macrófagos pró-inflamatórios

**M2**: macrófagos anti-inflamatórios

**mHg**: milímetros de mercúrio

**Min**: minuto

**mmol/L**; milimol/litro

**mU/L**: microunidade/ litro

**OMS**: Organização Mundial da Saúde

**PAM**: pressão arterial média

**PCR**: reação em cadeia da polimerase

**PGC-1 $\alpha$** : coativador 1  $\alpha$  receptor ativado por proliferador doperoxissoma

**PGC-1 $\beta$** : coativador 1  $\beta$  receptor ativado por proliferador doperoxissoma

**PI3K**: fosfatidilinositol 3 quinase

**PIP2**: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

**PIP3:** fosfatidilinositol 3,4,5 - trifosfato

**PPAR-  $\alpha$ :** coativador alfa dos receptores ativados por proliferadores dos peroxissomais

**PPAR-  $\gamma$ :** coativador gama dos receptores ativados por proliferadores dos peroxissomais

**Pprc-1 $\gamma$ :** coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

**qRT-PCR:** reação em cadeia da polimerase em tempo real

**RPM:** rotações por minuto

**SHR:** ratos espontaneamente hipertensos

**SM:** síndrome metabólica

**SM-SED:** animais submetidos à dieta hiperlipídica e mantidos sedentários

**SM-TF:** animais submetidos à dieta hiperlipídica e ao treinamento físico

**SNS:** sistema nervoso simpático

**TA:** tecido adiposo

**TAG:** triacilglicerol

**TAB:** tecido adiposo branco

**TAM:** tecido adiposo marrom

**TAM/TAB:** Relação tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco

**TAV:** tecido adiposo visceral

**TF:** treinamento físico

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral

**U A:** unidade arbitrária

**UCP1:** isoforma 1 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

**UCP2:** isoforma 2 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

**UCP3:** isoforma 3 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

**UCPs:** proteínas desacopladoras da cadeia respiratória

**VLDL:** lipoproteína de muito baixa densidade

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
3.1 Objetivo geral .....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 Animais.....	15
4.2 Protocolo Experimental.....	15
4.3 Definição dos grupos.....	16
4.4 Indução da Síndrome Metabólica .....	16
4.5 Treinamento Físico.....	17
4.6 Avaliação indireta da pressão arterial média através de pletismografia de cauda.....	18
4.7 Avaliação do lactato sanguíneo em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	19
4.8 Avaliação da temperatura corporal em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	20
4.9 Avaliação da ingesta alimentar em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	20
4.10 Avaliação do peso dos animais e dos órgãos, Índice de Lee e do Índice de adiposidade.....	20
4.11 Análises Bioquímicas.....	21
4.12 Cálculo HOMA IR e HOMA $\beta$ .....	21
4.13 Análise da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	22
4.13.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	22
4.13.2 Extração de RNA total.....	22
4.13.3 Síntese de cDNA.....	23
4.13.4 Expressão por qRT- PCR .....	24
4.13.5 Curva de eficiência e amplificação dos primers .....	25
4.14 Análise estatística.....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>

5.1 Avaliação do lactato sanguíneo em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	26
5.2 Avaliação da temperatura corporal em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	27
5.3 Avaliação da ingesta alimentar em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	28
5.4 Avaliação da pressão arterial média e a frequência cardíaca em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	29
5.5 Avaliação dos parâmetros biométricos em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	29
5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	32
5.7 Avaliação da resistência à insulina em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	34
5.8 Avaliação da via de sinalização da insulina nos tecidos adiposos branco (retroperitoneal) e marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico.....	35
5.9 Avaliação das expressões gênicas das adipocinas pró-inflamatórias nos tecidos adiposos branco (retroperitoneal) e marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	38
5.10 Avaliação da expressão gênica da adipocina anti-inflamatória adiponectina e seu receptor 1 no tecido adiposo retroperitoneal de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	40
5.11 Avaliação do depósito intraescapular da expressão gênica de UCP-1 e de PPAR $\gamma$ 2 de tecido adiposo marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	42

5.12 Avaliação das expressões gênicas de PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , UCP1, UCP2 e UCP3 no músculo gastrocnêmico de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico .....	44
<b>6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O estilo de vida moderno caracterizado pelo sedentarismo, estresse e mudanças nos hábitos alimentares como o consumo de alimentos industrializados, ricos em carboidratos e lipídeos tem aumentado a ocorrência da síndrome metabólica (Adeoye *et al.*, 2015; Farhangi *et al.*, 2015).

A síndrome metabólica é uma doença contemporânea (Huang, 2009) descrita pela primeira vez em 1988 (Reaven, 1988) onde observou a ocorrência simultânea de resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e dislipidemia. Essa associação de sintomas foi denominada de “Síndrome X” (Reaven 1988), sendo substituída por síndrome metabólica no final da década de 1990 pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990).

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) em 2005 estabeleceu a obesidade visceral como fator crucial para o diagnóstico sendo considerada a principal evidência relacionada à SM (Shah *et al.*, 2014).

O tecido adiposo branco é um órgão complexo, multifuncional com implicações autócrina, parácrina e endócrina (Sethi e Vidal-Puig, 2007; Gollisch *et al.*, 2009). É composto de adipócitos, matriz extracelular, vasos sanguíneos, nervos e vários outros tipos de células, incluindo pré-adipócitos, células estaminais e células imunitárias (Kalupahana, Claycombe e Moustaid-Moussa, 2011). Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para síntese do ácido graxo a partir das lipoproteínas circulantes quilomícrons e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), para síntese de lipídeos (lipogênese) e para mobilização de lipídeos estocados (lipólise) (Ahima e Flier, 2000). O adipócito branco maduro armazena os triacilgliceróis em uma única e grande gota lipídica que pode ocupar até 85% da massa total do tecido (Rodríguez *et al.*, 2015). Além disso, apresenta pouca inervação e vascularização (Giordano *et al.*, 2014).

O tecido adiposo branco é dividido em depósito subcutâneo e visceral com diferenças na organização estrutural, tamanho celular e função

biológica (Cinti, 1999; Cinti *et al.*, 2005; Fruhbeck, 2008; Frontini e Cinti, 2010). A distribuição de gordura entre estes depósitos parece ser mais importante do que a massa total de tecido adiposo para o risco de desenvolvimento de doenças associadas à síndrome metabólica (Bjørndal *et al.*, 2011). O tecido adiposo visceral possui maior correlação com o desenvolvimento de alterações metabólicas, como a resistência à insulina (Rosa, 2005; Chan, 2004), diabetes tipo 2, aterosclerose (Goodpaster, Thaete e Kelley, 2000; Fruhbeck *et al.*, 2001; Gollisch *et al.*, 2009).

A obesidade central é caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos do tecido adiposo visceral e pelo desenvolvimento de um processo inflamatório no qual ocorre uma infiltração e uma ativação de macrófagos pró-inflamatórios (M1) e uma redução dos macrófagos anti-inflamatórios (M2) (Galic, Oakhill e Steinberg, 2010) que secretam fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Engstrom *et al.*, 2003) e interleucina-6 (IL-6) (De Ferranti e Mozaffarian, 2008) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), (Hsieh *et al.*, 2009).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória com efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, que age diretamente no adipócito interferindo em diversos processos dependentes da insulina, como homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios (Sethi e Hotamisligil, 1999). O TNF- $\alpha$  prejudica diretamente a captação e o metabolismo intracelular da insulina, através da promoção das alterações na via de sinalização intracelular da insulina, como aumento da fosforilação da p70 S6 quinase, da quinase  $\frac{1}{2}$  e da quinase c-Jun-NH2-terminal (JNK) e aumenta a fosforilação inibitória no resíduo de serina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e diminui a fosforilação do resíduo de tirosina do IRS-1 (Plomgaard *et al.*, 2005). Esses eventos estão associados com a redução da fosforilação do substrato 160 KDa (AS160) da proteína quinase B (AKT) e piora da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para membrana (Balistreri, Caruso e Candore, 2010). Essa citocina também estimula a lipólise, reduz a atividade da lipase lipoprotéica (LPL) no endotélio vascular, estimula a síntese e a secreção de leptina pelo tecido adiposo, induz apoptose em adipócitos maduros e inibe a expressão coativador gama dos receptores ativados por

proliferadores dos peroxissomais (PPAR $\gamma$ ) (Hotamisligil, 2003; Oller e Udekwu, 2004; Ryden *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005).

A leptina é um hormônio polipeptídico não glicosilado de 16 kDa produzido principalmente pelo tecido adiposo branco, mas é encontrado também no estômago, na placenta, no tecido adiposo marrom e no músculo esquelético (Hillebrand, De Wied e Adan, 2002; Badman e Flier, 2005; Galic, Oakhill e Steinberg, 2010)

Além dos efeitos da leptina sobre o balanço energético, estudos tem mostrado que a leptina reduz a secreção de insulina, inibe a lipogênese induzida pela insulina e antagoniza a ação inibitória da insulina sobre a lipólise, melhora a resistência à insulina e modula o sistema imunológico (Ducy *et al.*, 2000; Otero *et al.*, 2005).

Há uma relação direta entre o grau de adiposidade e os níveis circulantes de leptina e diversos estudos mostraram aumento dos níveis séricos de leptina durante processos infecciosos e inflamatórios, que é provavelmente, secundário ao aumento de interleucinas 1 $\beta$  e 6 (IL-1  $\beta$  e IL-6) e TNF- $\alpha$  (Krysiak, Okopien e Herman, 2005; Lago *et al.*, 2007).

A resistina é uma adipocina que está relacionada à obesidade e ao diabetes, através da indução da resistência à insulina (Steppan *et al.*, 2001). Há ainda evidências de que a obesidade induzida por dietas hiperlipídicas, bem como mutações do gene da leptina estão associadas com elevadas concentrações circulantes de resistina (Savage *et al.*, 2001). O tecido adiposo branco produz pequenas quantidades de resistina (Savage *et al.*, 2001), enquanto níveis elevados são detectáveis em células mononucleares da circulação periférica (CMSPs) (Patel *et al.*, 2003). A resistina induz a produção de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  pelas CMSPs (Patel *et al.*, 2003; Nagaev *et al.*, 2006). A superexpressão de resistina em hepatócitos humanos prejudica a captação de glicose estimulada pela insulina e pela síntese de glicogênio. Parte do mecanismo para a síntese de glicogênio é prejudicada porque a resistina diminui a expressão de um dos substratos do receptor de insulina (IRS-2) (Takeishi *et al.*, 2007).

Ciclooxigenase 2 (COX-2) é responsável pela produção de prostaglandinas provenientes do ácido araquidônico em células inflamatórias. A enzima ciclooxigenase apresenta duas isoformas intituladas



COX-1 e COX-2. A COX-2 foi inicialmente identificada como induzida apenas em situações de trauma tissular e processos inflamatórios (Perazella, 2001; Yaksh *et al.*, 2001). Sua expressão nos macrófagos e nas células endoteliais é induzida por IL-1 e por TNF- $\alpha$  (Wu *et al.*, 2006). O COX-2 é um mediador inflamatório que apresenta atividade e expressão alterada nos distúrbios do metabolismo lipídico e da glicose, na diferenciação de pré-adipócitos, na redução da sensibilidade à insulina, na hipertensão e inflamação (Hsieh *et al.*, 2009).

A adiponectina é uma adipocina composta por 224 aminoácidos com peso molecular 30 kDa. É produzida principalmente pelos tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom. Em oposição à maioria das outras adipocinas como a leptina, resistina, os níveis de adiponectina estão diminuídos durante a obesidade, provavelmente devido a um *downregulation* promovida pelas citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 (Hotta, Hirshman e Emala, 2000; Tantini *et al.*, 2002; Lago *et al.*, 2007; Ouchi e Walsh, 2007; Steffens e Mach, 2008). Observa-se também uma correlação negativa entre baixos níveis de adiponectina e a gravidade da síndrome metabólica (Okamoto *et al.*, 2006; Fantuzzi, 2008).

Em macrófagos, a adiponectina inibe o efeito do TNF- $\alpha$  através da redução da ativação do fator nuclear kappa B e aumento na expressão da interleucina 6 (Ouchi *et al.*, 1999; Ouchi *et al.*, 2007). A adiponectina reduz a produção de glicose hepática e a concentração de triacilglicerol nos músculos. Esses efeitos são devidos à ativação do PPAR $\alpha$ , elevação da  $\beta$ -oxidação e pela estimulação da AMPK, que inibe a gliconeogênese hepática e estimula a translocação da GLUT-4 para a membrana da fibra muscular (Terauchi e Kadowaki, 2005). Dois receptores de adiponectina foram descritos, adipoR1 e adipoR2 são expressos no tecido adiposo, macrófagos e células beta pancreáticas (Whitehead *et al.*, 2006). O receptor de adiponectina 1 (adipoR1) é altamente expresso no músculo esquelético e receptor de adiponectina 2 (adipoR2) é predominantemente expresso no fígado.

A Adipsina (fator de complemento D) é um dos componentes do complemento derivados do tecido adiposo branco, que são necessários para a produção enzimática da proteína estimuladora de acilação (ASP), uma

proteína de complemento que afeta o metabolismo lipídico e da glicose (Cianflone, 2003). Estudo de Kwon e colaboradores (2012) mostraram que a adiposina correlaciona-se positivamente com a adiposidade, resistência à insulina, dislipidemia e doenças cardiovasculares (Kwon *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que a adiposina possui um efeito anti-inflamatório, protetor contra a obesidade, atuando na melhora da sensibilidade a insulina (Mamane *et al.*, 2009; Beazley *et al.*, 2013; Lo *et al.*, 2014).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomais (PPARs) são um grupo de proteínas que funcionam como fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes. A atividade transcricional dos PPARs requer ligação de ligantes específicos, heterodimerização com o RXR e a interação com coativadores de transcrição, tais como o coativador 1  $\alpha$  dos receptores ativados por proliferadores dos peroxissomais (PGC1- $\alpha$ ) e (PGC1- $\beta$ ) (Berger *et al.*, 2002) que participam da biogênese mitocondrial e termogênese adaptativa em diferentes tecidos (Hsieh *et al.*, 2009; Espinoza *et al.*, 2010). Os PPARs são um grupo de três isoformas de receptores nucleares que são: PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  (Berger *et al.*, 2002). O PPAR $\beta$  é expresso predominantemente no cérebro, no tecido adiposo e na pele. O PPAR $\alpha$  é expresso no fígado, nos rins, no coração, no músculo e no tecido adiposo (Tyagi *et al.*, 2011). Já o PPAR $\gamma$  possui 3 subformas, são elas: PPAR $\gamma_1$  expresso no coração, no músculo, no cólon, no rim, no pâncreas e no baço; PPAR $\gamma_2$  expresso principalmente no tecido adiposo branco e; PPAR $\gamma_3$  expresso em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco (Nan *et al.*, 2009). O PPAR $\gamma$  é essencial na adipogênese e na sensibilidade à insulina (Nan *et al.*, 2009). Essa proteína estimula a produção de pequenos adipócitos sensíveis à insulina, este pode ser o mecanismo pelo qual o PPAR $\gamma$  produz maior captação de glicose dependente de insulina protegendo tecidos sensíveis à insulina de aporte excessivo de ácidos graxos e garantindo adequada produção e secreção de adiponectina e leptina pelo tecido adiposo (Wajchenberg, 2000).

A resistência à insulina é um estado em que os tecidos sensíveis à insulina, ou seja, tecido adiposo, fígado e músculo não respondem adequadamente aos níveis circulantes normais de insulina. Para compensar

esta resposta inadequada, as células- $\beta$  pancreáticas aumentam a produção de insulina levando a hiperinsulinemia (Dominici *et al.*, 2014).

O receptor de insulina (IR) é uma proteína tetramérica que consiste em duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  leva a ativação da atividade cinase da subunidade  $\beta$ , seguido pela autofosforilação dos resíduos de tirosina da subunidade  $\beta$  e a um aumento na sua atividade cinase. A cinase do IR fosforila os resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS) 1 e 2. Quando os resíduos de tirosina do IRS-1e 2 são fosforilados, os IRS ligam-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), ativando-a. A P13K converte o seu substrato, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), no mensageiro lipídico fosfatidilinositol 3,4,5 - trifosfato (PIP3). O PIP3 então se liga a proteína cinase B (AKT). A AKT continua a propagação do sinal hormonal ao ativar a proteína AS160 que irá sensibilizar as pequenas proteínas ao redor do transportador de glicose 4 (GLUT4), favorecendo a sua translocação até a membrana lipídica para captação da glicose (Westhoff, Rau e Zink, 2007).

Os mecanismos moleculares que levam ao aparecimento da resistência à insulina não estão completamente compreendidos. No entanto, é sabido que o *cross-talk* entre a insulina e outros hormônios, como a Angiotensina II, o cortisol, a adrenalina (epinefrina), o hormônio do crescimento, a leptina e a adiponectina, pode modular a via de sinalização da insulina (Coppari e Bjørnbæk, 2012).

Em oposição ao observado com o tecido adiposo branco durante a síndrome metabólica, o tecido adiposo marrom tem sido considerado como importante sistema na regulação metabólica. Os adipócitos marrons são multiloculares, ou seja, seu citoplasma contém várias gotículas lipídicas, mitocôndrias grandes e ainda são ricamente vascularizados. As mitocôndrias contêm a proteína desacopladora 1 (UCP1) que dissipa a força motriz de protons na forma de calor e pequena quantidade da enzima ATP sintase (Van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009); (Virtanen *et al.*, 2009).

A ativação do tecido adiposo marrom ocorre pelos termorreceptores sensíveis ao frio localizados sobre a pele, no interior do corpo, no cérebro e na espinha transmitem sinais térmicos para a área pré-óptica no hipotálamo (Morrison, Madden e Tupone, 2014) e regiões do tronco cerebral (Bartness,

Vaughan e Song, 2010), ativando as fibras pós-ganglionares simpáticas que liberam noradrenalina que favorece a termogênese (Lowell e Spiegelman, 2000). Após a exposição a temperaturas baixas ou ingestão aguda de alimentos, o cérebro estimula a ativação o sistema nervoso simpático. Nos adipócitos marrons maduros, catecolaminas liberadas ativam o hormônio lipase sensível e estimulam a lipólise. O resultado é o aumento de ácidos graxos livres que ativam a UCP-1 (Cannon e Nedergaard, 2004). A noradrenalina interage com o receptor  $\beta$  que aumenta a expressão de PGC-1 $\alpha$  (Collins, Yehuda-Shnaidman e Wang, 2010).

A estimulação do sistema nervoso simpático pelo treinamento físico pode promover efeitos sobre o tecido adiposo marrom de forma aguda (lipólise e ativação de UCP-1) e de forma crônica (transcrição do gene da UCP-1, biogênese mitocondrial, hiperplasia do tecido adiposo marrom, recrutamento de adipócitos marrons em tecido adiposo branco) (Ruiz *et al.*, 2015). O processo de desacoplamento da cadeia respiratória e produção de calor pelo tecido adiposo marrom são realizados através da *upregulation* e aumento da atividade das proteínas de desacoplamento da cadeia respiratória (UCPs), que se situam na membrana mitocondrial e desfazem os gradientes de concentração e iônico formado entre membranas mitocondriais, promovendo o desvio de prótons que seriam utilizados para formar ATP. As proteínas desacopladoras (UCPs) são membros da família de proteínas carreadoras mitocondriais que incluem a UCP-1, UCP-2 e UCP-3 (Jia *et al.*, 2010). A UCP-1 está localizada na membrana mitocondrial interna e o seu mecanismo de ação é desacoplar a fosforilação oxidativa no tecido adiposo marrom (Rousset *et al.*, 2004). A atividade da UCP-1 é regulada pelos ácidos graxos livres que são os principais substratos para a oxidação durante a termogênese. Estudos propõem que a UCP-1 seja um carreador da forma reduzida dos ácidos graxos (ânion), que são oxidados no espaço intermembranar e retornam para a matriz, onde são reduzidos para liberar o próton (Krauss, Zhang e Lowell, 2005). Outras duas novas isoformas foram identificadas UCP-2 e UCP-3 e são mais amplamente expressas que a UCP1. A UCP2 é expressa no músculo esquelético, coração, placenta, linfócitos, intestino, pulmão, fígado, rins, pâncreas e tecido adiposo branco. A UCP 3 é expressa no tecido adiposo marrom e

músculo. Entre as funções da UCP2 e UCP3 estão o controle da termogênese adaptativa em resposta à exposição ao frio e à dieta; controle da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria; regulação da síntese da ATP e regulação da oxidação de ácidos graxos livres (Li *et al.*, 2010).

Os coativadores 1 dos receptores ativados por proliferadores dos peroxissomais (PGC-1)  $\alpha$  e  $\beta$  se ligam a vários fatores de transcrição, levando ao aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e aumento da função respiratória, promovendo aumento da capacidade enzimática para  $\beta$  oxidação de ácidos graxos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Soyal *et al.*, 2006). O PGC1- $\alpha$  é expresso no tecido adiposo, no coração, nos rins, no fígado, no pâncreas e no músculo. No músculo, PGC1- $\alpha$  ativa a via de oxidação de ácidos graxos através da fosforilação oxidativa, a biogênese mitocondrial e a termogênese. No treinamento físico a expressão gênica da PGC1- $\alpha$  é aumentada pela ativação da via AMPK (Henagan *et al.*, 2014).

O sedentarismo constitui um dos principais problemas de saúde pública mundial por ser um dos fatores diretamente relacionado ao desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica (Tudor-Locke *et al.*, 2015). Estudos epidemiológicos (Lessiani *et al.*, 2015; Tudor-Locke *et al.*, 2015) mostram que cerca de 50 a 80% da população mundial é considerada sedentária. O estado de sedentarismo ou de treinamento físico interfere diretamente no metabolismo do indivíduo (Matsudo e cols, 2005 (Tudor-Locke *et al.*, 2015). O balanço energético é resultado da ingestão calórica e do dispêndio de energia. E o dispêndio energético proporcionado pelo treinamento físico é um dos fatores mais importantes na redução do peso corporal, contribuindo para a diminuição da incidência de outras doenças associadas à obesidade e à síndrome metabólica (Kazak *et al.*, 2015).

O treinamento físico tem sido utilizado para prevenção e tratamento complementar de diferentes doenças relacionadas aos distúrbios metabólicos. O treinamento físico aumenta a taxa metabólica e reduz a obesidade (Pedrero-Chamizo *et al.*, 2015), melhora do perfil glicêmico de pacientes com diabetes tipo 2, além de melhorar o perfil lipídico (Karjalainen *et al.*, 2015), reduzir a hipertensão e diminuir a atividade elevada do sistema

nervoso simpático (Alosco *et al.*, 2015). Além disso, o treinamento físico pode reduzir a pressão sanguínea e o fluxo simpático em indivíduos normais (Goessler *et al.*, 2015).

Estudo de revisão de Eriksson e colaboradores, 1997, mostrou que o treinamento físico submetido a indivíduos jovens e antes da ocorrência de danos irreversíveis, aliado a modificação na dieta é eficaz em induzir benefícios em várias doenças isoladas, relacionadas à síndrome metabólica (Eriksson, Taimela e Koivisto, 1997). Ensaios clínicos randomizados têm demonstrado que o treinamento físico tem um efeito positivo em muitos fatores de risco metabólicos e cardiovasculares que estão relacionados com a síndrome metabólica (Salonen *et al.*, 2015). De fato, alguns trabalhos (Castro *et al.*, 2015); (Morvan *et al.*, 2013) na literatura tem mostrado a efetividade do treinamento físico na prevenção do desenvolvimento da síndrome metabólica em modelos animais, porém há poucos dados na literatura referente à efetividade do treinamento físico como tratamento da síndrome metabólica tanto em modelos animais como em pacientes (Fournier *et al.*, 2015).

Como mencionado anteriormente, dados da literatura mostram em modelos animais, que o treinamento físico iniciado juntamente com dieta para indução de diferentes alterações características da síndrome metabólica em humanos promove benefícios sobre alguns desses distúrbios durante o desenvolvimento da síndrome metabólica. Estudos de Mostarda e colaboradores, 2012 mostraram que o treinamento físico em esteira rolante por 10 semanas preveniu a disfunção diastólica induzida pela síndrome metabólica em ratos wistar que receberam frutose na água potável (Mostarda *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos de Touati e colaboradores, 2010 mostraram que o treinamento físico em esteira rolante por 12 semanas induziu redução da adiposidade, melhora nos níveis da glicose e da insulina e do perfil lipídico e ainda exerceu um efeito anti-hipertensivo em ratos Sprague-Dawley submetidos à dieta rica em gordura (Touati *et al.*, 2011).

Apesar de não haver mais dúvidas sobre os benefícios do treinamento físico em prevenir o aparecimento de várias doenças crônicas, pouco se sabe do efeito do treinamento físico atuando como tratamento dessas doenças já estabelecidas. Atualmente poucos estudos têm começado a

investigar o possível benefício do treinamento físico em reduzir distúrbios que ocorrem na síndrome metabólica já estabelecida. Caponi e colaboradores, 2013 mostraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que receberam nos dez primeiros dias de vida injeção subcutânea de glutamato monossódico (5 mg/kg de peso corporal) para indução da síndrome metabólica e submetidos ao treinamento físico de esteira por dez semanas, sete meses após o desmame, apresentaram redução da pressão sanguínea sistólica, aumento da sensibilidade à insulina e da expressão gênica do GLUT4 no tecido adiposo branco e músculo gastrocnêmico (Caponi *et al.*, 2013). Recentemente, Machado e cols, 2014 mostraram em ratos Wistar Kyoto submetidos à dieta hiperlipídica por 32 semanas e submetidos à esteira por 12 semanas apresentaram melhora nas alterações microvasculares, reversão à resistência à insulina e a intolerância à glicose. No entanto, não foram investigados os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos benéficos do treinamento físico no metabolismo da glicose (Machado *et al.*, 2014). Apesar de esses estudos serem iniciais e terem avaliado poucos parâmetros alterados da síndrome metabólica e principalmente não terem visto os mecanismos pelos quais o treinamento físico possa atuar, esses estudos sugerem uma possível função terapêutica do treinamento físico na síndrome metabólica.

Também como já mencionado, para os estudos da síndrome metabólica tem se utilizado diferentes modelos animais submetidos a diferentes dietas e idades na tentativa de descobrir um modelo que melhor reproduza os diferentes distúrbios da síndrome metabólica característicos em humanos (Panchal, Ward e Brown, 2013; Wang *et al.*, 2015). Estudo realizado em nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013) com o objetivo de definir a dieta e a idade para induzir os distúrbios característicos da síndrome metabólica humana em ratos, mostrou que ratos adultos submetidos a dieta rica em frutose apresentam maiores alterações no metabolismo de lipídios e na indução do acúmulo de gordura ectópica no fígado e no rim. Enquanto a dieta hiperlipídica administrada á ratos jovens induziu a elevação da pressão arterial média e da frequência cardíaca e o aumento do estoque de lipídeo visceral. Em adição as dietas hiperlipídica e rica em frutose induziram o depósito excessivo de glicogênio hepático nos

ratos adultos e jovens respectivamente. Esses dados mostraram que a idade em que o animal inicia a dieta é determinante na manifestação dos distúrbios da síndrome metabólica. Logo, em ratos jovens a dieta hiperlipídica constitui a intervenção nutricional mais eficaz na indução de alterações bioquímica, histológica, fisiológica e no desenvolvimento de distúrbios característicos da síndrome metabólica em humanos. Por essa razão nesse presente estudo optamos por utilizar a dieta hiperlipídica para ratos após quatro semanas de vida.

Nos últimos anos a síndrome metabólica tem sido alvo de muitos estudos devido ao aumento de sua incidência. Além disso, a síndrome metabólica apresenta múltiplas causas e grande variabilidade na manifestação dos distúrbios entre pacientes. Esses fatores dificultam o tratamento da síndrome metabólica e torna fundamental o entendimento dos mecanismos relacionados à doença e principalmente possíveis formas de tratamento para o conjunto de manifestações clínicas.

Diante dessas considerações, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico como tratamento da síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos sobre os tecidos adiposos branco e marrom e músculo gastrocnêmico.



## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a síndrome metabólica tem sido alvo de muitos estudos devido ao aumento da incidência dessa doença e devido ao fato da doença apresentar múltiplas causas e grande variabilidade na manifestação dos distúrbios entre pacientes.

Na literatura já está descrito (Mostarda *et al.*, 2012; Touati *et al.*, 2011; Morvan *et al.*, 2013) que o treinamento físico é eficaz em induzir benefícios como forma de prevenção da síndrome metabólica, ou seja, o treinamento físico inicia-se junto com o início da submissão da dieta em modelos animais para desenvolver distúrbios característicos da síndrome metabólica em humanos. Porém, sabemos que indivíduos sedentários apresentam menor adesão à prática regular do treinamento físico e apresentam grande chance de desenvolverem obesidade e demais fatores de risco para a síndrome metabólica. Nesse sentido, poucos estudos da literatura (Caponi *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014) têm buscado evidências do treinamento físico como tratamento da síndrome metabólica já estabelecida.

Assim, nosso presente estudo possui como inovação avaliar o efeito do treinamento físico como tratamento da síndrome metabólica já instalada induzida por dieta hiperlipídica em ratos sobre os tecidos adiposos branco e marrom e músculo gastrocnêmico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito terapêutico do treinamento físico sobre diferentes parâmetros associados à síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito do treinamento físico em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica sobre:

1. o condicionamento físico;
2. a variação ou não da temperatura corporal antes e após natação;
3. a ingesta alimentar;
4. os parâmetros cardiovasculares;
5. os parâmetros biométricos como o peso corporal, o peso do fígado, do rim, do ventrículo esquerdo, dos músculos (gastrocnêmico e sóleo), depósitos de tecido adiposo (inguinal, retroperitoneal e epididimal), índice de Lee, índice de adiposidade;
6. os parâmetros bioquímicos como o colesterol total, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), os triglicérides, a lipoproteína de alta densidade (HDL), a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a amilase, a creatinina, a uréia, as proteínas totais, a albumina, a globulina;
7. a resistência à insulina através dos níveis da glicose de jejum, da insulina, do modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA IR) e do modelo de avaliação da homeostase da capacidade das células  $\beta$  (HOMA  $\beta$ );
8. a via de sinalização da insulina através da expressão gênica do receptor de insulina (IR), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2), proteína cinase B (AKT), transportador de glicose 4 (GLUT-4) no tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo marrom;

9. as expressões gênicas das adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo marrom;

10. as expressões gênicas da adiponectina e do receptor da adiponectina 1 no tecido adiposo retroperitoneal;

11. o depósito intraescapular do tecido adiposo marrom, a TAM/TAB, e a expressão gênica da proteína desacopladora 1 (UCP-1) e do receptor ativado por proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) no tecido adiposo marrom;

12. a expressão gênica coativador 1  $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ), coativador 1  $\beta$  do receptor ativado por proliferador do peroxissoma, PGC1- $\beta$ , proteína desacopladora-1 (UCP-1), proteína desacopladora-2 (UCP-2) e proteína desacopladora-3 (UCP-3) no músculo gastrocnêmico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Fisher, recém-desmamados, com 4 semanas de idade (ratos jovens, 40 – 60g) provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX/UFOP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, Brasil). Os animais permaneceram em gaiolas individuais e em ciclo claro-escuro 12h – 12h no Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP). Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e às dietas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Ouro Preto nº do protocolo 2011/31.

### 4.2 Protocolo Experimental

Após a 4ª semana de vida os animais receberam dieta específica para cada grupo (dieta Controle - AIN-93M ou dieta Hiperlipídica- 30% de banha) até o final do experimento. Após sete semanas de consumo alimentar, os mesmos eram submetidos a dois tratamentos, ao sedentarismo (SED) e ao TF. Após seis semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta, pesagem dos órgãos e avaliações bioquímicas, análise pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR). O delineamento experimental é esquematicamente representado a seguir:

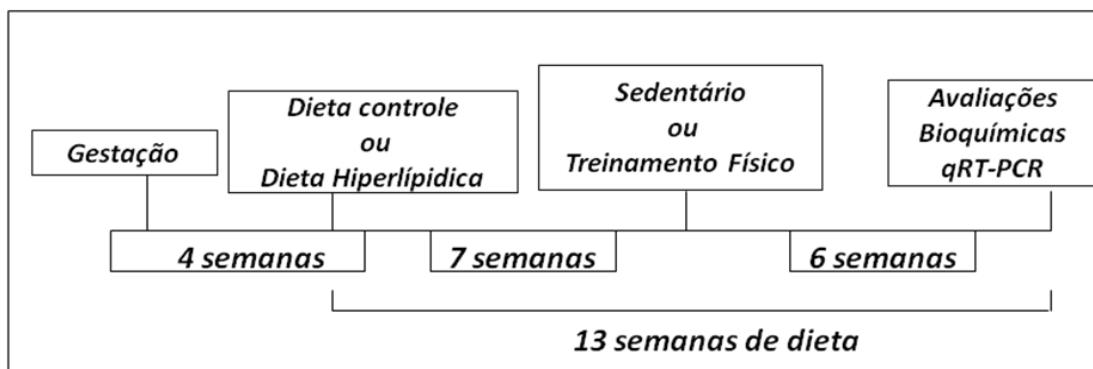


Figura 1: Delineamento experimental

### **4.3 Definição dos grupos**

Os ratos foram randomicamente divididos em dois grupos, submetidos à dieta controle e a dieta hiperlipídica durante sete semanas logo após o desmame. Após seis semanas de dieta iniciou-se o protocolo do TF e/ ou SED e os animais, a partir de então, foram divididos em quatro grupos:

- Controle-Sedentário (CT-SED): Ratos submetidos à dieta controle e mantidos sedentários por 13 semanas;
- Controle-Treinamento físico (CT-TF): Ratos submetidos à dieta controle por 13 semanas e submetidos à natação por 6 semanas;
- SM-Sedentário (SM-SED): Ratos submetidos à dieta hiperlipídica e mantidos sedentários por 13 semanas;
- SM-Treinamento físico (SM-TF): Ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 13 semanas e submetidos à natação por 6 semanas;

### **4.4 Indução da Síndrome Metabólica**

Para a indução da SM substituiu-se a dieta controle AIN-93M, (Reeves, 1997) por uma dieta hiperlipídica contendo 30% de banha (fornecedor: Pragsoluções). Todos os animais receberam a dieta a partir da quarta semana de vida, logo após o desmame e foi mantida por 13 semanas. Os animais controle foram submetidos à dieta controle AIN-93M, (Reeves, 1997) durante o mesmo período. A composição das dietas esta descrita na figura 2.

<i>Dieta AIN 93 M</i>			<i>Dieta Hiperlipídica</i>		
Ingredientes	p/ 1 Kg	Un	Ingredientes	p/ 1 Kg	Un
Amido de milho	465,700	g	Leite condensado	316,000	g
Caseína	140,000	g	Caseína	180,000	g
Amido dextrinizado	155,000	g	Frutose	33,500	g
Sacarose	100,000	g	Sacarose	70,000	g
Óleo de soja	40,000	g	BANHA	300,000	g
Fibra (Cel. Microcrist.)	50,000	g	Fibra (Cel. Microcrist.)	50,000	g
L-cistina	1,800	g	L-cistina	3,000	g
Bit. Colina	2,500	g	Bit. Colina	2,500	g
BHT	0,008	g	BHT	0,000	g
Mix mineral	35,000	g	Mix mineral	35,000	g
Mix vitamínico	10,000	g	Mix vitamínico	10,000	g
<b>Kcal/g</b>	<b>3,80</b>		<b>Kcal/g</b>	<b>5,20</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>1000,0</b>		<b>TOTAL</b>	<b>1000,0</b>	

Figura 2: Composição das dietas (g/Kg) consumidas pelos animais que iniciaram o experimento com quatro semanas de idade durante treze semanas. AIN 93 M = dieta controle de manutenção e dieta hiperlipídica.

#### 4.5 Treinamento Físico

Os grupos CT-TF e SM-TF foram submetidos à natação como forma de treinamento físico. O treinamento físico foi realizado cinco vezes por semana, durante seis semanas, tendo início a partir da sétima semana de implementação das dietas. As sessões ocorreram em tanques coletivos (4-6 ratos por tanque) com a água na temperatura de  $31 \pm 2$  °C, mantida por um termostato.

Na primeira sessão de treinamento físico os grupos CT-TF e SM-TF foram submetidos à 20 minutos de treinamento físico, na segunda sessão à 40 minutos e da terceira sessão em diante os animais nadaram 60 minutos. Na semana inicial os animais não utilizaram sobrecarga adicional à massa corporal a fim de promover a adaptação.

A partir da segunda semana, deu-se início ao treinamento físico com sobrecarga. As sobrecargas foram obtidas a partir da fixação de porcas e/ou arruelas, por meio de gomas elásticas, à porção proximal da cauda do

animal. Para efeito adaptativo, da sexta a oitava sessão, os animais realizaram o treinamento físico com sobrecarga de  $1\% \pm 0,05$  g de sua massa corporal. Na nona e décima sessão foi utilizada uma carga de  $1,5\% \pm 0,05$  g; e da décima primeira a décima terceira sessão, a carga foi de  $2\% \pm 0,05$  g da massa corporal.

A partir da décima quarta sessão de treinamento físico foi utilizada uma sobrecarga de  $2,5\% \pm 0,05$  g da massa corporal. Devido às possíveis alterações na massa corporal dos animais ao longo do treinamento físico, foram realizadas manutenções da sobrecarga a cada três sessões.

O grupo de animais CT-SED e SM-SED foram colocados em baldes com água rasa  $\pm 15$  centímetros para efeito de indução de um estresse semelhante aos dos animais treinados, os mesmos foram manipulados todos os dias de treino.

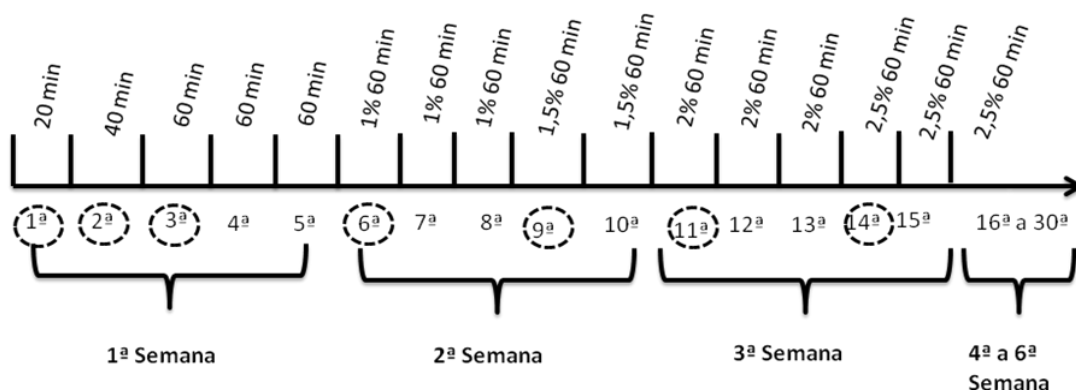


Figura 3: Programa de treinamento físico

#### 4.6 Avaliação indireta da pressão arterial média através de pletismografia de cauda

A avaliação da pressão arterial média e da frequência cardíaca por pletismografia de cauda foi realizada na 7ª e na 13ª semana de experimento, nos grupos de animais CT-SED, CT-TF, SM-SED e SM-TF.

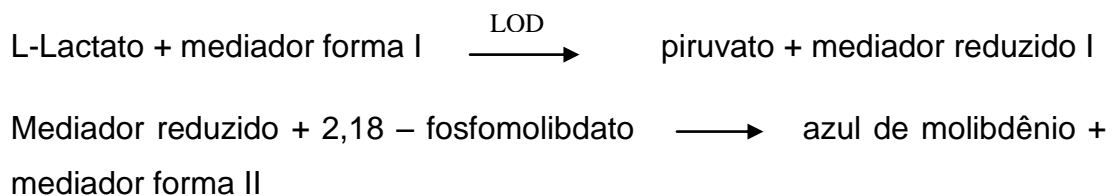
O animal foi colocado em um sistema de contenção para ratos (LE 5022, Panlab) e permaneceu em uma caixa de aquecimento (LE 5610, Panlab) para facilitar as medidas de pressão arterial média. Neste sistema de contenção somente a cauda do animal fica mantida exteriorizada na qual foi acoplado um manguito de borracha e um transdutor (LE 5160-R, Panlab)

para registro da pressão arterial média e frequência cardíaca. Cerca de cinco mensurações foram realizadas em cada animal e a média foi utilizada nas análises dos resultados.

#### **4.7 Avaliação do lactato sanguíneo em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Com a intenção de avaliar o condicionamento físico dos ratos (CT-TF, e SM-TF) após a realização do protocolo de treinamento físico foi mensurado o lactato sanguíneo, através do teste de lactato pelo método de tiras testes e analisador Accutrend® Lactate (Roche), conforme instruções do fabricante e de acordo com (Soares *et al.*, 2011).

O princípio do teste se baseia na aplicação da amostra de sangue na zona reativa da tira. O sangue passa através de uma rede protetora até uma camada de vidro, onde os eritrócitos ficam retidos, de modo que apenas o plasma sanguíneo penetre na zona de detecção. O lactato é determinado através de um fotômetro de reflexão pela reação colorimétrica do medidor lactato-oxidase (LOD) e um comprimento de onda de 657 nm:



Para verificar o efeito do treinamento físico nos grupos CT-TF e SM-TF foi realizado um teste 48 horas após a última sessão de treinamento físico e exposição à água rasa (ratos CT-SED e SM-SED). Todos os ratos foram submetidos individualmente a uma única série de natação por 30 minutos com sobrecarga de 2,5 % do peso corporal. Foi realizada coleta de sangue imediatamente após a sessão de treinamento físico para dosagem do lactato.



#### **4.8 Avaliação da temperatura corporal em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Com o objetivo de avaliar se ocorreria variação da temperatura corporal durante o treinamento físico (natação) mensurou-se a temperatura corporal de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica, cinco minutos, antes e após o treinamento físico.

A medição da temperatura corporal foi realizada com termômetro retal veterinário Vet Thermometer® de acordo com as orientações do fabricante. A medição da temperatura foi realizada semanalmente 5 minutos antes e após a natação.

#### **4.9 Avaliação da ingesta alimentar em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento físico sobre a ingesta alimentar mensurou-se a quantidade alimentar ingerida por ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais por dois dias na 6<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana. E a pesagem da ingesta alimentar foi realizada pela manhã.

#### **4.10 Avaliação do peso dos animais e dos órgãos, Índice de Lee e do Índice de adiposidade**

Todos os animais foram pesados a cada duas semanas até o final do protocolo experimental. Ao final das treze semanas das dietas, foram realizadas as medidas do comprimento naso-anal mensuradas para cálculo do Índice de Lee, indicado pela equação:  $[\text{peso corporal (g)}^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000]$  e em seguida foram eutanasiados e os órgãos rins, fígado e ventrículo esquerdo, os músculos gastrocnêmico e sóleo, tiveram seus pesos úmidos (g/ 100g do rato) avaliados. Os depósitos de tecido adiposo inguinal, retroperitoneal, epididimal foram dissecados e pesados (g/ 100g do rato) e foi realizado o índice de adiposidade através da fórmula  $[\text{Peso absoluto (g) dos depósitos de gordura inguinal + retroperitoneal +$

epididimal / peso do rato (g) x 100] (Levin, 1992) e depósito de tecido adiposo marrom intraescapular foi dissecado e pesado (g/ 100g do rato).

#### **4.11 Análises Bioquímicas**

Após a eutanásia dos animais submetidos ao jejum noturno foram coletadas amostras de sangue (2 a 3 ml). Em seguida, estas amostras foram centrifugadas (4000 rpm; 4°C; 6 min) para a separação do plasma para dosagem da glicose de jejum (sangue tratado com anticoagulante *Glistab*; EDTA e fluoreto de potássio) ou soro para dosagens de colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, proteínas totais, albumina, creatinina, uréia e das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Plasma e soro foram aliquotados e guardados a – 20°C, para realização das análises bioquímicas. As análises foram realizadas através kits comerciais individuais (Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As análises foram realizadas no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC/UFOP).

#### **4.12 Cálculo HOMA IR e HOMA $\beta$**

As variáveis que estimam a resistência à insulina utilizadas no presente estudo foram calculadas a partir das seguintes fórmulas:

HOMA-IR - modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

$$\text{HOMA-IR} = (\text{IJ} \times \text{GJ}) / 22,5$$

HOMA- $\beta$  - Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células  $\beta$

$$\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{IJ}) / (\text{GJ} - 3,5)$$

IJ = insulinemia de jejum em mU/L

GJ = glicemia de jejum em mmol/L (Matthews *et al.*, 1985)

## 4.13 Análise da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

### 4.13.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os primers específicos para os genes em estudo foram baseados na sequência de mRNA depositados no banco de dados RGD (Rat Genome Database) disponível em <http://rgd.mcg.edu/> e foram idealizados pelo programa Gene Runner (version 3.05) conforme tabela:

Gene	Número de acesso (RGDID)	Sequência primer (5'- 3')
Rn18s	01117.1	F 5'-GTAAGTGCGGGTCATAAG-3' R 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3'
Insr	2917	F 5'-CCTTGGATCGTTCCTCTCAC-3' R 5'-GGTCCGTTTGATGCTCAGAG-3'
Irs-1	2922	F 5'-TGAGAGCGGTGGTGGTAAGC-3' R 5'-GGGCTGCTGGTGTGGAATC-3'
Irs-2	69316	F 5'-GCAGGACTTCCAGTGAACG-3' R 5'-GCCACACCACATTCGCATG-3'
AKT-2	2082	F 5'-GGAGGTCATGGAGCATCGGTTTC-3' R 5'-GTTTGAAGGGTGGCAGGAGC-3'
Slc2a4	2711	F 5'-GGTGCCTTGGAACACTCAAC-3' R 5'-TGCAGGAGAGCAGGGAGTACTG-3'
PPAR $\gamma$	3371	F 5'-CGTGAAGCCCATCGAGGACATC-3' R 5'-TCTGGAGCACCTTGCGAACAG-3'
UCP-1	012682	F 5'-CAAAGTCCGCCTCAGATC-3' R 5'-TGGTGATGGTCCCTAAGAC-3'
UCP-2	019354.2	F: 5'-CTGGCGGTGGTCCGAGATAC-3' R: 5' GGGCAACATTGGGAGAGGTC 3'
UCP-3	013167.2	F 5'-CCCAAAGGAACGGACCACTC-3' R 5'-GGGTTGAGCACAGGTCACTG-3'
PGC-1 $\alpha$	031347.1	F 5'-GCACAAGCACAACCTCAGCAAGTGCTG-3' R 5'-CCAAACAGCCGTAGACTG-3'
PGC-1 $\beta$	727948	F TGAGGAGGTGGGAGAGGTTG-3' R TGGGAACCTTGGGCACTGTTG-3'
Leptin	013076.2	F 5'-CAGGCTCTCTGGCTTCTG-3' R 5'-GAGACCTCCTCCATCTGCTG-3'
Resistin	628781	F 5'-CCAGAAGGCACAACCGTCAC-3' R 5'-CCAGAAGGCACAACCGTCAC-3'
Adpisin	2498	F 5'-GTGTCGTGCCTCAGCCTCTTC-3' R 5'-CCTCCTTGTTGGGACCGATC-3'
TNF- $\alpha$	3876	F 5'-GTGTCTGTGCCTCAGCCTCTTC-3' R 5'-CCTCCTTGTTGGGACCGATC-3'
COX-2	620349	F 5'-ATCTGGCTTCGGGAGCACAAC-3' R 5'-CCAACAGCGATGGAGGAC-3'
Adiponectin	628748	F 5'-GCCGTTCTCTTCACCTACACC-3' R 5'-GGTCTCCACCTCCAGATGG-3'
Adiponectin receptor 1	1303151	F 5'-GCCATGGAGAAGATGGAGGA-3' R 5'-AGCACGTCGTACGGGATGA-3'

Primers usados (*Forward e Reverse*)

#### **4.13.2 Extração de RNA total**

Cerca de 150 mg de tecido adiposo retroperitoneal, 100 mg de tecido adiposo marrom e músculo gastrocnêmico foram usados para obtenção do RNA total utilizando o kit SV Total Isolation System (Promega™) seguindo a recomendação do fabricante. Resumidamente 150 mg de tecido adiposo retroperitoneal, 100 mg de tecido adiposo marrom e músculo gastrocnêmico foram homogeneizados com auxílio de um homogenizador tipo Politrón (Homogenizador Ultra 80) com 1 mL de trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen™) em 5 pulsos de 30 segundos com intervalo de 40 segundos no gelo. Depois de incubados a temperatura ambiente por 10 minutos foi adicionado 400 µl de clorofórmio (Sigma ST. Louis, MO, USA) e homogeneizado por 1 minuto com auxílio de um vórtex, seguido de uma incubação de 25 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 x g (~ 11.000 rpm; 4° C). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf e foi adicionado 600 µl de etanol 95% (Sigma ST. Louis, MO, USA) preparado com H<sub>2</sub>O livre de RNAses para precipitar os ácidos nucleicos e transferida para a coluna de ligação que acompanha o kit. Em seguida, o RNA foi purificado com o kit SV Total Isolation System (Promega™) conforme instrução do fabricante. O controle de qualidade do RNA foi realizado a partir da quantificação e avaliação do grau de pureza do mesmo pelo aparelho Nanovue<sup>®</sup> (GE) seguida da análise das preparações em gel de agarose (1,2%) TBE/Formamida (figura 3). A densidade óptica (quantificação) do RNA extraído foi mensurada no comprimento de onda a 260 nm, enquanto a relação entre os comprimentos de onda 260/280 foi indicativa de pureza e a relação 260/230 indicativa de contaminação. As razões acima de 1,8 foram aceitas como adequadas para quantificação da expressão gênica.

#### **4.13.3 Síntese de cDNA**

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando 1 µg de RNA total extraído e o kit High Capacity RT-PCR System (Applied Biosystems) seguindo a recomendação do fabricante. Para cada 1 µg de RNA total foram utilizados 2 µL de primers randômicos (10 x RT Buffer), 0,8 de dNTPs [25x

dNTP mix (100  $\mu$ M)], 1  $\mu$ L de transcriptase reversa (Multi scribe reverse transcriptase) e H<sub>2</sub>O livre de RNase para um volume final de 10  $\mu$ L. Essa preparação foi adicionada ao RNA (1  $\mu$ g) e foi mantida no gelo até a programação do termociclador (Biocycler, version 3.2). A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a temperatura de 37°C, 85°C por 5 minutos e finalmente 4°C por tempo indeterminado. A amostra foi estocada a – 80°C.

#### 4.13.4 Expressão por qRT- PCR

Para análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações foram realizadas pelo kit SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96 Well Reaction Plate- Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film - Applied Biosystems) ao final do experimento. Foram pipetados 3  $\mu$ L de primer liofilizado (na concentração de 2,5  $\mu$ M) e 7  $\mu$ L de mix de reação contendo (2  $\mu$ L de cDNA diluído 5 vezes com água livre de DNase e 5  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix totalizando um volume de 10  $\mu$ L de reação em cada poço. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados, com o gene de referência (rRNA 18S) chamado de normalizador, que foi escolhido entre outros 11 genes citotivos endógenos para cada tecido. O rRNA 18S foi escolhido por apresentar menor variação entre as amostras de diferentes grupos experimentais, por não formar dímeros com si próprio, por apresentar um pico de ativação na curva de dissociação anterior a 80°C e por apresentar eficiência entre 80% e 120% de acordo com os critérios descritos mais a frente. O gene normalizador estava presente em todas as placas e os outros genes alvo eram comparados com ele. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3-15 ciclos. O *threshold* foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto da PCR e, portanto, fixado em 0,2 para todas as amostras, uma vez que se comparou o mesmo gene em diferentes grupos.

As análises foram feitas pelo método de quantificação absoluta da expressão gênica (Cq comparativo  $2^{-\Delta Cq}$ ) que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre as amostras. Os níveis

dos genes foram normalizados pelos níveis do gene de referência (rRNA 18S) em cada placa. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do gene alvo, normalizado para o gene calibrador, dada por  $2^{-\Delta Cq}$ . A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems.

#### **4.13.5 Curva de eficiência e amplificação dos primers**

Para determinar as eficiências da amplificação dos alvos e do gene de referência foram construídas curvas padrões para cada amplicon a partir de uma mesma amostra. O ensaio foi realizado em triplicata. A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-log do valor de Cq (eixo Y) em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X). O slope da curva padrão foi usado para estimar a eficiência de amplificação. Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ( $\log_2 10 = 3,3219$ ), ou seja, o amplicon dobra em quantidade durante a fase geométrica. O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi obtido pela fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Os primers foram considerados apropriados para avaliar a expressão gênica pelo SYBR<sup>®</sup> Green quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%.

#### **4.14 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Prism 5 for Windows*, (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média com o respectivo erro padrão da média para os animais de cada dieta. Todos os parâmetros foram analisados por ANOVA *one-way*, seguido do pós-teste Bonferroni. O nível de significância foi previamente fixado em  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do lactato sanguíneo em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Para verificar o condicionamento físico induzido pelo treinamento físico mensurou-se os níveis de lactato sanguíneo de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Como mostrado na figura 4, os animais do grupo SM-SED ( $17,05 \pm 0,80$   $n=6$ ) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) dos níveis de lactato comparados ao grupo CT-SED ( $9,7 \pm 1,02$   $n=6$ ). O grupo SM-TF ( $8,9 \pm 0,58$   $n=6$ ) apresentou redução ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo SM-SED e similar ao grupo CT-SED. Não foi observado diferença entre os grupos controles (CT-SED e CT-TF).

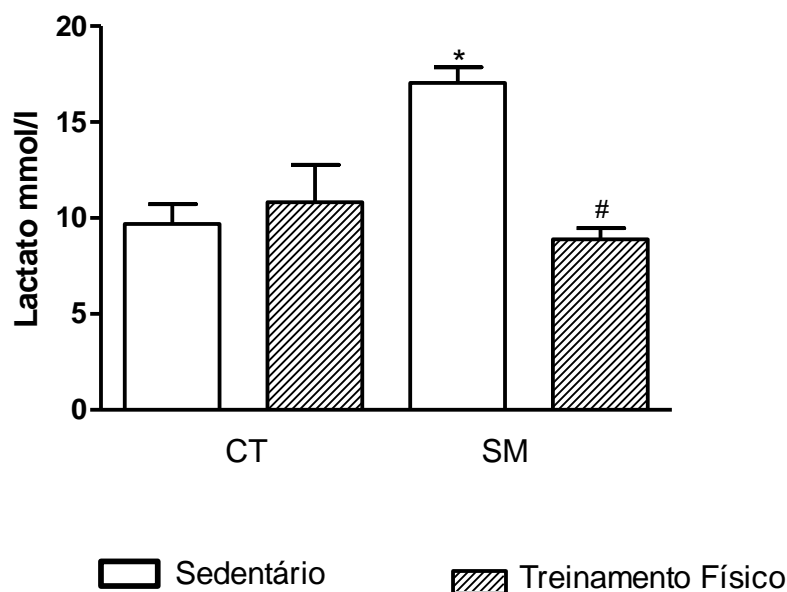
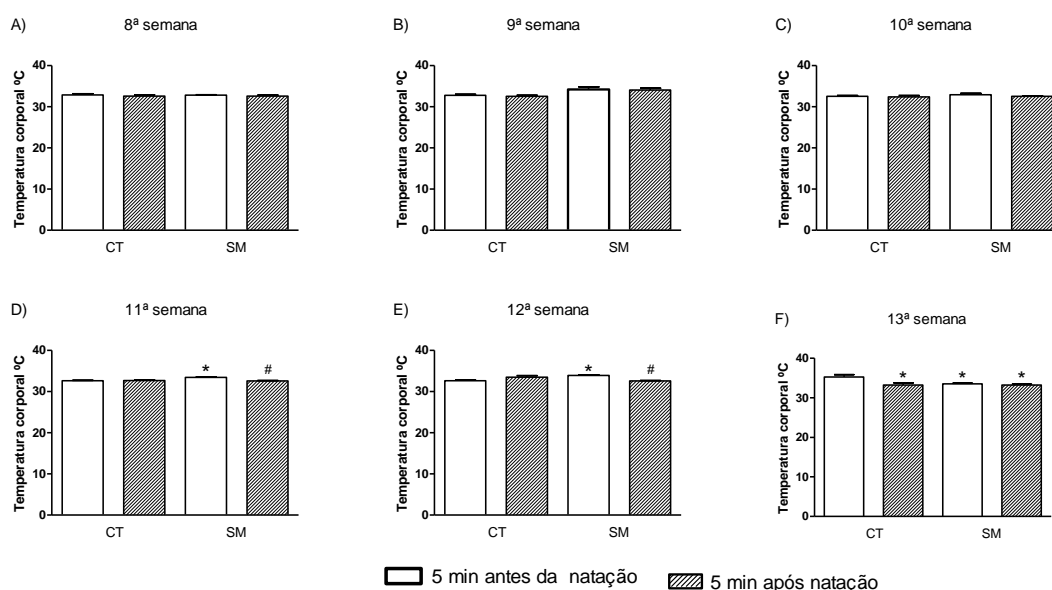


Figura 4: Avaliação do lactato sanguíneo de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $N = 6$

## 5.2. Avaliação da temperatura corporal em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Com o objetivo de avaliar se ocorreria variação da temperatura corporal durante o treinamento físico (natação) mensurou-se a temperatura corporal em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica cinco minutos, antes e após, o treinamento físico.

Como mostrado na figura 5, os animais do grupo SM-TF apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da temperatura corporal cinco minutos, antes do treinamento físico e redução ( $p < 0,05$ ) cinco minutos após o treinamento físico na 11ª, 12ª comparados ao grupo CT-TF. Já, na 13ª semana o grupo SM-TF cinco minutos antes e após o treinamento físico e o CT-TF cinco minutos após o treinamento físico apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) da temperatura corporal comparado ao grupo CT-TF cinco minutos antes do treinamento físico. ( $n=6$ ).



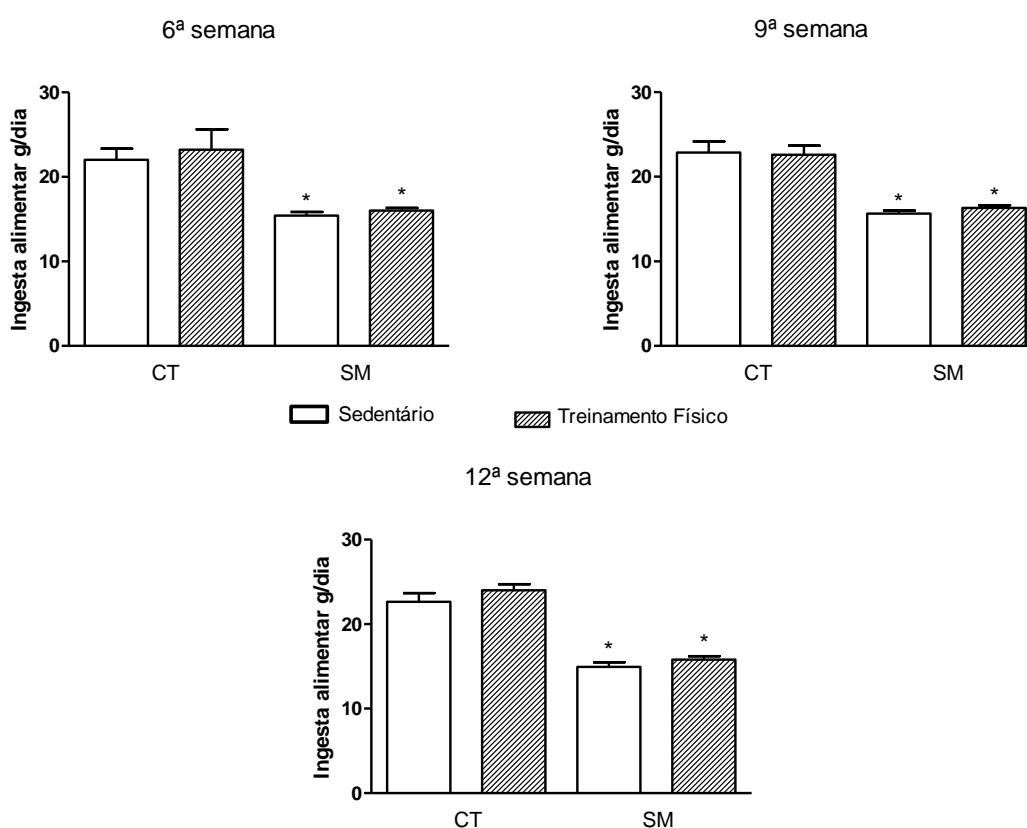
**Figura 5:** Avaliação da temperatura corporal 5 minutos, antes e após, o treinamento físico na 8ª, 9ª, 10ª, 11ª, 12 e 13ª semana de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram submetidos ao treinamento físico de natação durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $N = 6$



### 5.3. Avaliação da ingesta alimentar em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento físico sobre a ingesta alimentar mensurou-se a quantidade alimentar ingerida por ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Como mostrado na figura 6, os animais dos grupos SM-SED e SM-TF apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) da ingesta alimentar comparados ao grupo CT-SED na 6<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana, respectivamente.

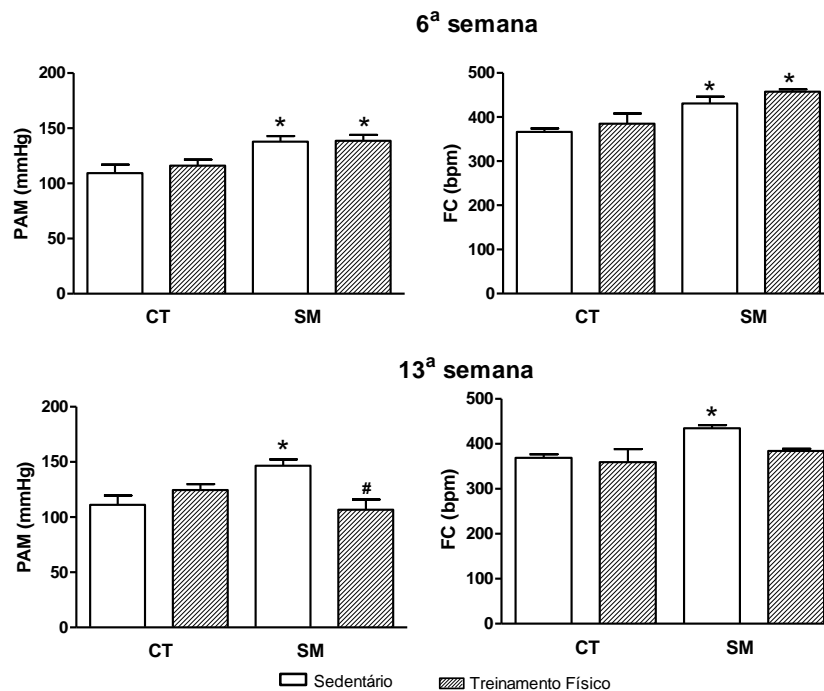


**Figura 6:** Avaliação da ingesta alimentar por dois dias consecutivos na 6<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. N = 6

#### 5.4. Avaliação da pressão arterial média e a frequência cardíaca em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento físico sobre os parâmetros cardiovasculares mensurou-se de forma indireta a pressão arterial média e a frequência cardíaca em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Como mostrado na figura 7, os animais dos grupos SM-SED e SM-TF apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da pressão arterial média e frequência cardíaca comparados ao grupo CT-SED na 6ª semana. Já na 13ª semana, os animais do grupo SM-SED apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) da pressão arterial e frequência cardíaca comparados ao grupo CT-SED. E, além disso, houve uma redução ( $p < 0,05$ ) da pressão arterial no grupo SM-TF comparado ao grupo SM-SED.



**Figura 7:** Avaliação indireta da pressão arterial média basal (PAM, mmHg), frequência cardíaca basal (FC: batimentos por minutos, bpm) na 6ª e 13ª semana de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 6

### **5.5 Avaliação dos parâmetros biométricos em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento físico sobre os parâmetros biométricos mensurou-se o peso do fígado, dos rins, do ventrículo esquerdo, dos músculos (gastrocnêmico e sóleo), dos depósitos de tecido adiposo branco (inguinal, retroperineal e epididimal) e corporal; calculou-se índice de Lee e de adiposidade de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Como mostrado na tabela 1, os animais do grupo SM-SED apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) do peso corporal, do depósito do tecido adiposo branco inguinal, retroperitoneal e epididimal e do índice de adiposidade quando comparados ao grupo CT-SED. O grupo CT-TF apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) do ventrículo esquerdo e do músculo gastrocnêmico quando comparado ao grupo CT-SED. Já, o grupo SM-TF apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) do ventrículo esquerdo, do músculo gastrocnêmico e redução ( $p < 0,05$ ) do peso corporal, do depósito do tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e epididimal e do índice de adiposidade quando comparado ao grupo SM-SED. E não foi observada diferença estatística entre os demais parâmetros.

Tabela 1: Avaliação do treinamento físico sobre parâmetros biométricos em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica

Peso	CT-SED	CT-TF	SM-SED	SM-TF
Peso corporal	285,60± 6,31	273,60± 10,64	316,60± 9,62*	287,10± 9,65 <sup>#</sup>
Fígado	2,98± 0,11	3,17± 0,07	2,80± 0,12	2,76± 0,08
Rim	0,61± 0,01	0,63± 0,02	0,58± 0,02	0,59± 0,01
Ventrículo Esquerdo	0,25± 0,01	0,29± 0,01*	0,25± 0,01	0,28± 0,01 <sup>**</sup>
Gastrocnêmico	1,09± 0,03	1,28± 0,03*	1,08± 0,03	1,25± 0,04 <sup>**</sup>
Sóleo	0,09± 0,01	0,10± 0,01	0,10± 0,01	0,10± 0,01
TA Inguinal	1,66± 0,07	1,45± 0,06	2,65± 0,19*	2,20± 0,12 <sup>**</sup>
TA Retroperitoneal	1,68± 0,10	1,50± 0,09	2,99± 0,12*	2,44± 0,16 <sup>**</sup>
TA Epididimal	1,53± 0,15	1,48± 0,12	2,48± 0,24*	1,92± 0,14 <sup>**</sup>
Índice Lee	0,29± 0,01	0,30± 0,01	0,30± 0,01	0,30 ± 0,01
Índice Adiposidade	4,86± 0,20	4,43± 0,21	7,77± 0,72*	6,07± 0,32 <sup>**</sup>
N	07	09	07	12

Tabela 1: Mensuração do peso corporal (g), do peso relativo (g/ 100g de peso do rato) de órgãos e tecidos, cálculo do índice de Lee [peso corporal (g)<sup>1/3</sup> /comprimento naso-anal (cm)x 1000] e de adiposidade [Peso absoluto (g) dos depósitos de gordura inguinal + retroperitoneal + epididimal / peso do rato (g) x 100] de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \*p<0,05 em comparação com os animais do grupo CT-SED. <sup>#</sup>p<0,05 em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média. N= número de animais. TA = tecido adiposo.

## **5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Com a intenção de avaliar o efeito do treinamento físico sobre os parâmetros bioquímicos foram mensurados os níveis do colesterol total, da lipoproteína de baixa densidade (LDL), da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), dos triacilgliceróis, da lipoproteína de alta densidade (HDL), da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST), da amilase, da creatinina, da uréia, das proteínas totais, da albumina, da globulina de ratos com SM induzida por dieta hiperlipídica.

A tabela 2 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica e sedentários (SM-SED) apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) nos níveis do colesterol total, do colesterol LDL e da ALT e redução dos níveis da VLDL e dos triacilgliceróis quando comparados ao grupo CT-SED. Os animais treinados e submetidos à dieta hiperlipídica (SM-TF) apresentaram um aumento nos níveis ( $p < 0,05$ ) da LDL e da ALT e redução dos níveis da VLDL e dos triacilgliceróis quando comparados ao grupo CT-SED. Além disso, o nível do colesterol total no grupo SM-TF foi similar ( $p > 0,05$ ) aos grupos CT-SED e SM-SED. E não foi observada diferença estatística entre os demais parâmetros.

Tabela 2: Avaliação do treinamento físico sobre os parâmetros bioquímicos de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Parâmetros	CT-SED	CT-TF	SM-SED	SM-TF
Colest.T (mmol/L)	1,76± 0,04	1,66± 0,05	1,98± 0,07*	1,83± 0,06
LDL (mmol/L)	0,28± 0,06	0,37± 0,06	0,71± 0,08*	0,60± 0,08*
VLDL (mmol/L)	0,73± 0,05	0,65± 0,04	0,39± 0,03*	0,29± 0,03*
TAG (mmol/L)	1,56± 0,10	1,36± 0,10	0,85± 0,06*	0,73± 0,06*
HDL (mmol/L)	0,73± 0,02	0,73± 0,02	0,71± 0,02	0,68± 0,02
ALT (U/l)	56,40± 1,52	62,29± 2,63	66,44± 2,02*	70,06± 3,08*
AST (U/l)	10,32± 3,33	14,46± 6,12	7,54± 2,62	11,22± 4,24
Amilase (U/L)	625,50±24,70	623,10±24,13	621,80±23,54	546,70±31,76
Creatinina (µmol/L)	53,59± 1,89	55,99± 2,55	53,04± 2,88	46,41± 4,50
Uréia (mmol/L)	5,43± 0,25	5,69± 0,49	5,23± 0,30	5,48± 0,15
Proteína Total (g/L)	85,75± 1,85	84,18± 1,69	83,83± 1,93	79,80± 2,51
Albumina (g/L)	4,24± 0,06	4,20± 0,05	4,19± 0,05	4,06± 0,06
Globulina (g/L)	43,71± 1,00	42,17± 1,50	41,76± 1,59	40,93± 1,64
N	16	11	15	15

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas \*p<0,05 em comparação com os animais do grupo CT-SED. #p<0,05 em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média ± erro padrão da média. Colesterol total (Coles.T), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), triacilglicerol (TAG) lipoproteína de alta densidade (HDL), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST)

## 5.7 Avaliação da resistência à insulina em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Com a intenção de avaliar o efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina foram mensurados os níveis da glicose de jejum, da insulina, HOMA IR, HOMA  $\beta$  de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A tabela 3 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica (SM-SED) apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) nos níveis da glicose jejum, da insulina, HOMA IR, HOMA  $\beta$  quando comparados ao grupo CT-SED. Já os animais treinados (SM-TF) apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) nos níveis insulina, HOMA IR, HOMA  $\beta$  quando comparados ao grupo SM-SED e similares ao grupo CT-SED. O nível da glicemia jejum no grupo SM-TF foi similar ( $p > 0,05$ ) aos grupos CT-SED e SM-SED.

Tabela 3: Avaliação do treinamento físico sobre a resistência à insulina de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

Parâmetros	CT-SED	CT-TF	SM-SED	SM-TF
GJ(mmol/L)	6,11 ± 0,14	6,0,8 ± 0,29	6,83 ± 0,13*	6,40 ± 0,32
Insulina (ng/ml)	0,96 ± 0,10	1,32 ± 0,22	2,22 ± 0,31*	1,10 ± 0,22 <sup>#</sup>
HOMA – IR	7,03 ± 0,90	8,66 ± 1,87	15,50 ± 2,43*	9,12 ± 1,78 <sup>#</sup>
HOMA – $\beta$	164,6 ± 15,4	201,7 ± 25,6	314,4 ± 46,1*	184,2 ± 21,2 <sup>#</sup>
N	16 – 8	11- 9	15 – 10	15-10

Tabela 3: Parâmetros e resistência a insulina animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. <sup>#</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Glicemia de jejum (GJ). Modelo de avaliação da homeostase da resistência a insulina (Homa-IR) = [insulina jejum (IJ) x (GJ)/ 22,5]. Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células  $\beta$  (Homa- $\beta$ ) = [20 x IJ) / (GJ – 3,5).

## **5.8 Avaliação da via de sinalização da insulina no tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Para avaliar o efeito do TF na via de sinalização da insulina mensurou-se através da técnica qRT-PCR a expressão gênica do receptor de insulina (IR), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2), proteína cinase B (AKT), transportador de glicose 4 (GLUT-4) no tecido adiposo retroperitoneal de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A figura 8 mostra via de sinalização no tecido adiposo retroperitoneal. Os animais do grupo SM-SED apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica do IR (painel A), IRS-1 (painel B), IRS-2 (painel C) e GLUT4 (painel E) em comparação ao grupo CT-SED. Enquanto o treinamento físico nos ratos SM-TF aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão gênica do IR (painel A), IRS-1 (painel B) e GLUT-4 (painel E), tornando esses valores similares ( $p > 0,05$ ) aos observados no grupo CT-SED. Já, a expressão gênica do IRS-2 (painel C) nos ratos SM-TF foi similar ( $p > 0,05$ ) ao grupo CT-SED e ao grupo SM-SED. E não foi observada diferença estatística na expressão gênica da AKT (painel D).

A figura 9 mostra que no tecido adiposo marrom dos animais submetidos à dieta hiperlipídica (SM-SED, SM-TF) apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica da AKT (painel D) e GLUT4 (painel E) em comparação ao grupo CT-SED. Enquanto o treinamento físico nos ratos SM-TF aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão gênica da AKT (painel D) e GLUT-4 (painel E), quando comparados ao grupo SM-SED. E não foi observada diferença estatística entre os demais parâmetros.



## Tecido Adiposo Retroperitoneal

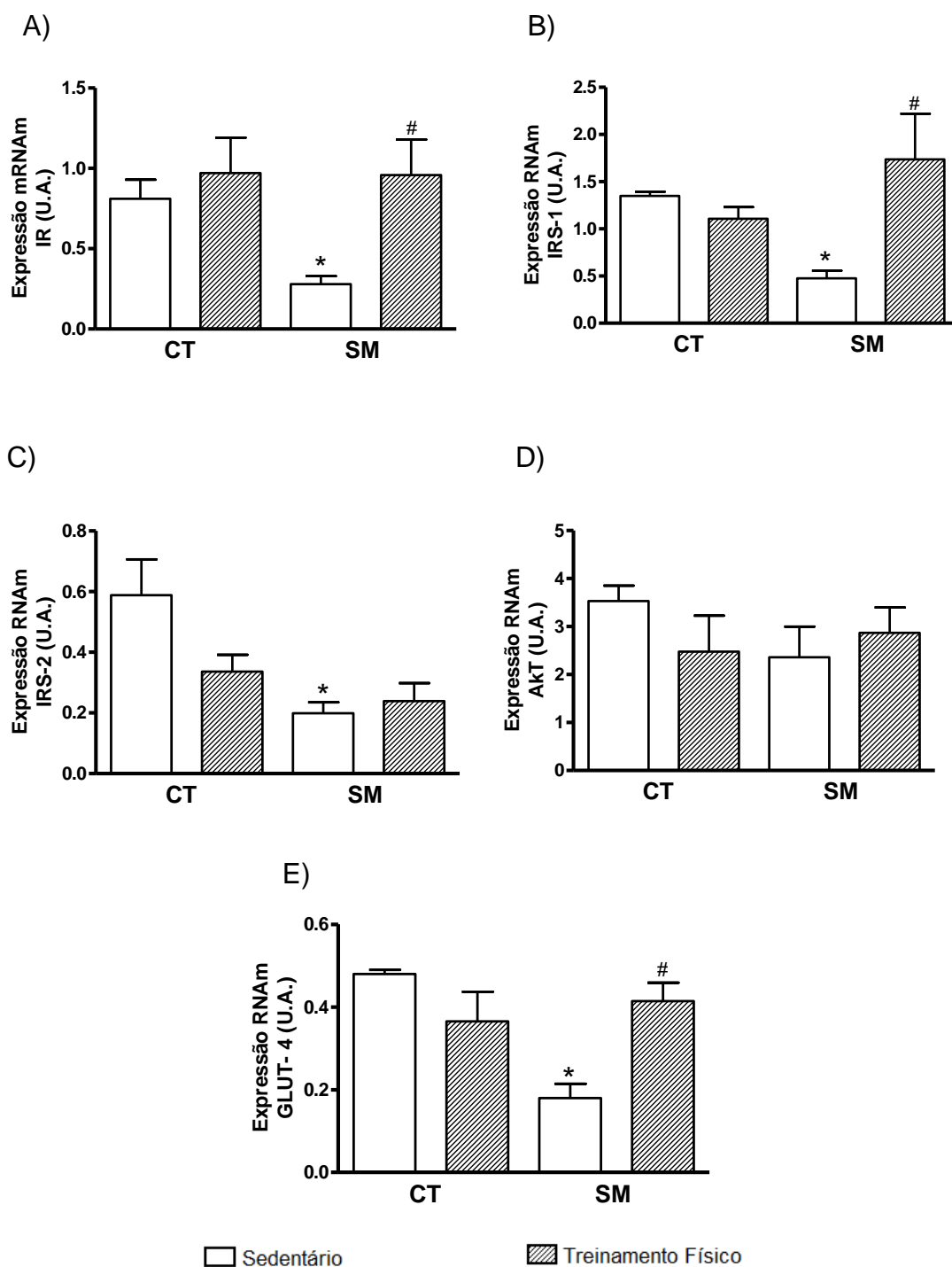


Figura 8: Avaliação através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) do receptor de insulina (IR, painel A), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1, painel B), substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2, painel C), proteína cinase B (AKT, painel D), transportador de glicose 4 (GLUT-4, painel E) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas de dieta. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 4

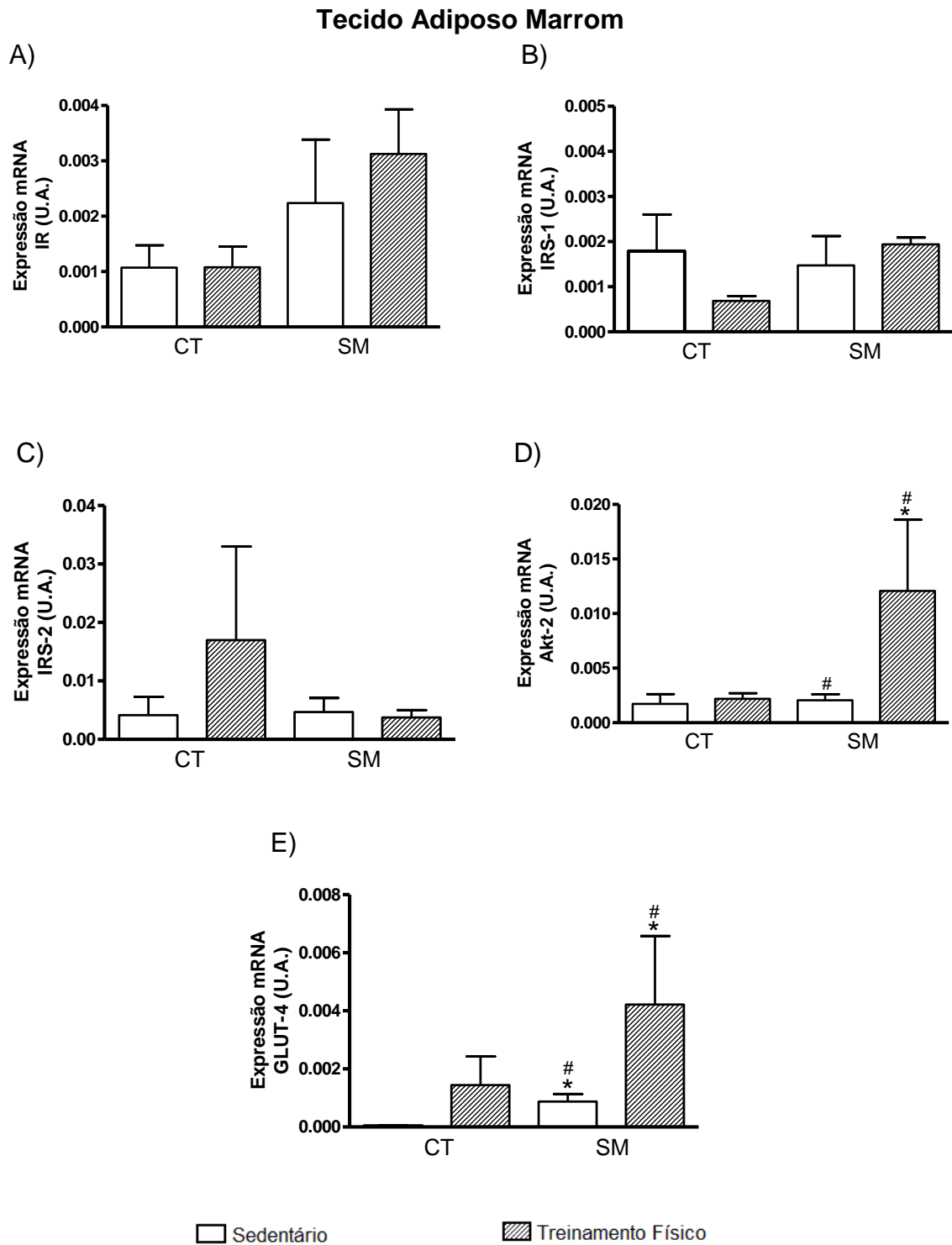


Figura 9: Avaliação através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) do receptor de insulina (IR, painel A), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1, painel B), substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2, painel C), proteína quinase B (AKT, painel D), transportador de glicose 4 (GLUT-4, painel E) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 4

### **5.9 Avaliação das expressões gênicas das adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo retroperitoneal e no tecido adiposo marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Para avaliar o efeito do treinamento físico sobre as adipocinas através da técnica qRT-PCR mensurou-se as expressões gênicas da leptina, da resistina, da adipsina, do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e da ciclooxigenase 2 (COX-2) no tecido adiposo retroperitoneal e da leptina e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A figura 10 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica (SM-SED) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica da leptina (painel A), da resistina (painel B), da adipsina (painel C), do TNF- $\alpha$  (painel D) e da COX-2 (painel E) comparado ao grupo CT-SED. Os animais treinados (SM-TF) apresentaram uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica da leptina (painel A), da resistina (painel B), da adipsina (painel C) e da COX-2 (painel E) em comparação ao grupo SM-SED. Já o valor de TNF- $\alpha$  foi similar ( $p > 0,05$ ) ao do grupo CT-SED.

A figura 11 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica e mantidos sedentários (SM-SED) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão de leptina (painel A) e TNF- $\alpha$  (painel B) comparados ao grupo CT-SED. O grupo (SM-SED) apresentou aumento da expressão gênica ( $p > 0,05$ ) de leptina (painel A) e TNF- $\alpha$  (painel B) comparado ao grupo CT-SED.

### Tecido Adiposo Retroperitoneal

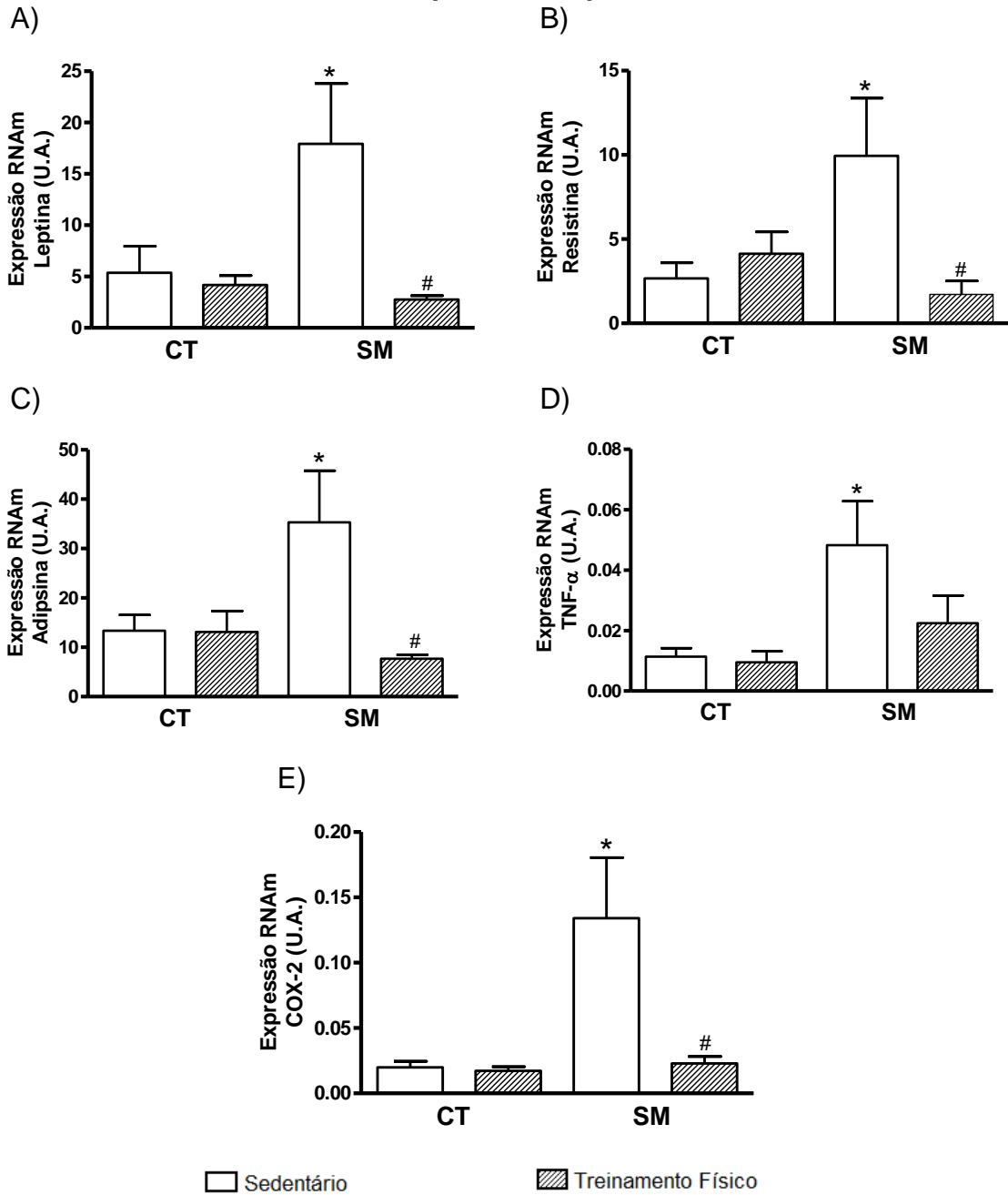


Figura 10: Avaliação através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) dos níveis da leptina (painel A), da resistina (painel B), da adipsina (painel C), do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , painel D) da ciclooxygenase 2 (COX-2, painel E) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas de dieta. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N= 4

## Tecido Adiposo Marrom

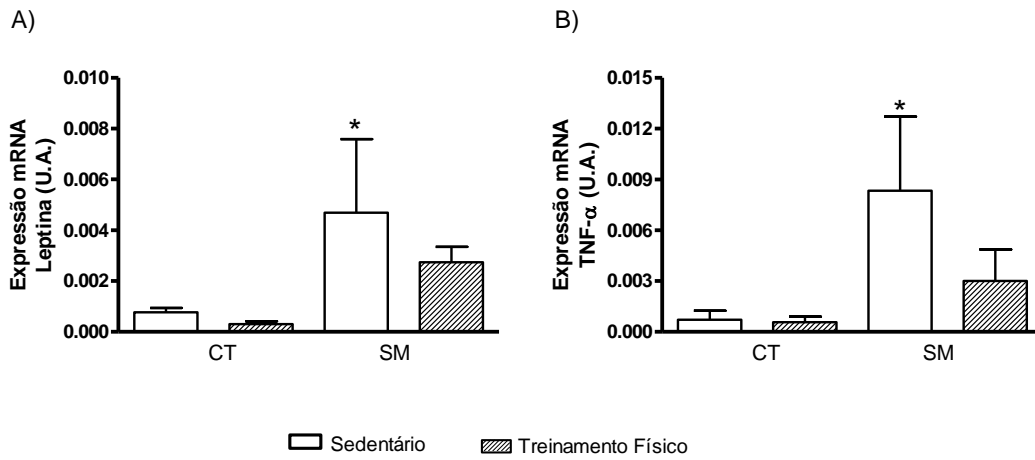


Figura 11: Expressão gênica através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) da leptina (Painel A), TNF $\alpha$  (Painel B) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas de dieta. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N=4

### 5.10 Avaliação da expressão gênica da adipocina anti-inflamatória adiponectina e seu receptor 1 no tecido adiposo retroperitoneal de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico

Para avaliar o efeito do treinamento físico sobre as adipocinas anti-inflamatórias através da técnica qRT-PCR mensurou-se as expressões gênicas da adiponectina e do receptor adiponectina 1 no tecido adiposo retroperitoneal de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A figura 12 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica (SM-SED) apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica da adiponectina (painel A) comparado ao grupo CT-SED. Os animais treinados (SM-TF) apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica do receptor de adiponectina 1 (painel B) e redução ( $p < 0,05$ ) da expressão do RNAm da adiponectina (painel A).

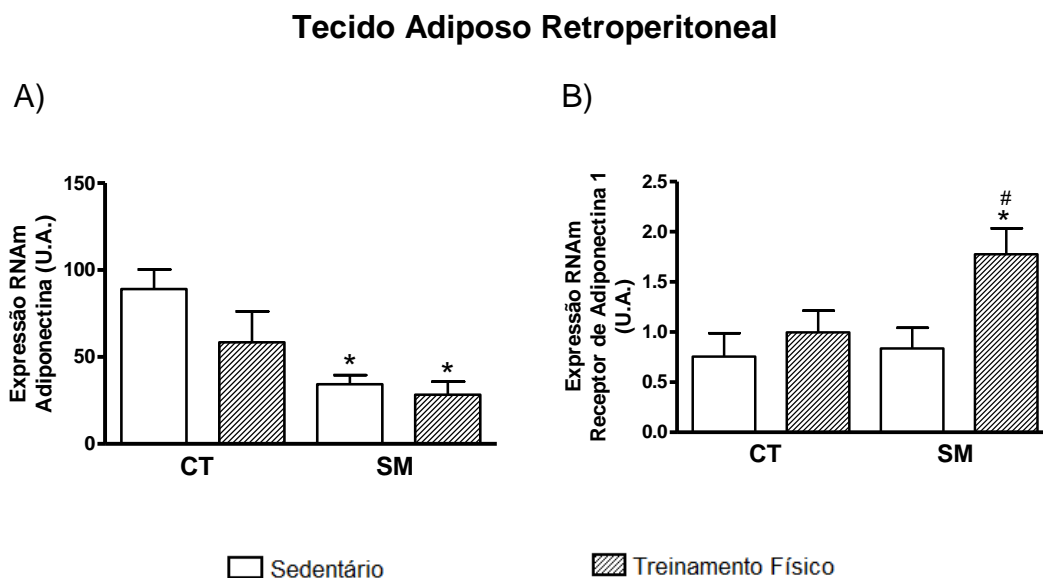


Figura 11: Avaliação através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) dos níveis da adiponectina (painel A) e do receptor adiponectina 1 (painel B) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N= 4

### **5.11 Avaliação do depósito intraescapular a expressão gênica de UCP-1 e PPAR $\gamma$ 2 de tecido adiposo marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Para avaliar o efeito do treinamento físico mensurou-se o peso intraescapular do tecido adiposo marrom, a relação entre tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB) e a expressão gênica da proteína desacopladora 1 (UCP-1) e do PPAR $\gamma$  no tecido adiposo marrom de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A figura 12 mostra que o treinamento físico (CT-TF e SM-TF) aumentou ( $p < 0,05$ ) o depósito do tecido adiposo marrom (painel A) e a relação TAM/TAB (painel B) quando comparados ao grupo CT-SED. Já a dieta hiperlipídica (SM-SED e SM-TF) aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão gênica da UCP-1 (painel C) quando comparado ao grupo CT-SED. Além disso, a expressão gênica da UCP-1 nos ratos SM-TF (painel C) foi maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo SM-SED. Além disso, a expressão gênica de PPAR $\gamma$ 2 nos ratos SM-TF (painel D) foi maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CT-SED e similar ao grupo SM-SED.

## Tecido Adiposo Marrom

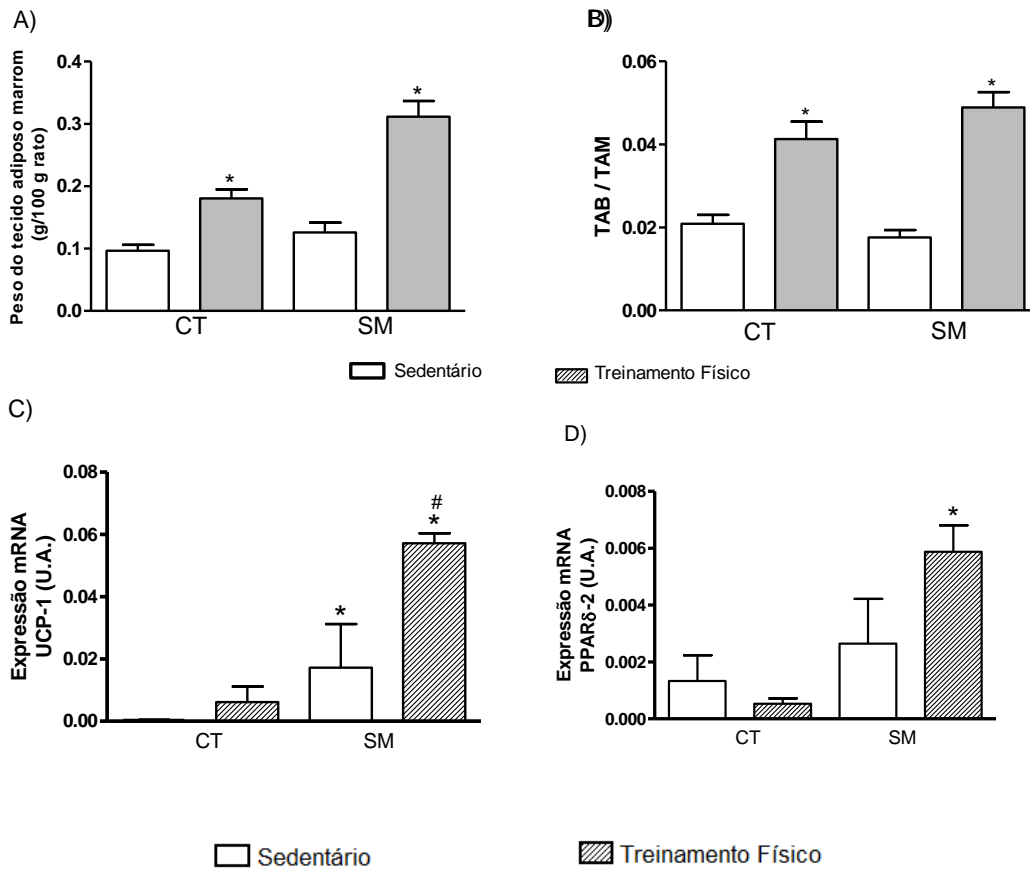


Figura 12: Peso relativo (g/ 100g de peso do rato) (g) de tecido adiposo marrom intraescapular (Painel A), relação entre tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB, Painel B) e expressão gênica através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) da proteína desacopladora 1 (UCP-1, Painel C, e PPAR $\gamma$ 2 (Painel D) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas de dieta. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N=4



### **5.12 Avaliação das expressões gênicas de PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , UCP1, UCP2 e UCP3 no músculo gastrocnêmico de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico**

Para avaliar o efeito do TF sobre a termogênese mensurou-se através da técnica qRT-PCR a expressão gênica de PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , UCP1, UCP2 e UCP3 no músculo gastrocnêmico de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A figura 13 mostra que os animais submetidos à dieta hiperlipídica mantidos sedentários (SM-SED) apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica de PGC1 $\alpha$  (painel A), PGC1 $\beta$  (painel B), da UCP-1 (painel C), UCP-2 (painel D) e UCP-3 (painel E) em comparação ao grupo CT-SED. Enquanto o treinamento físico nos ratos (SM-TF) aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão gênica de PGC1 $\alpha$  (painel A) UCP-2 (painel D) e UCP-3 (painel E) quando comparados aos grupos sedentários (CT-SED, SM-SED) e PGC1 $\beta$  (painel B), quando comparados ao grupo SM-SED.

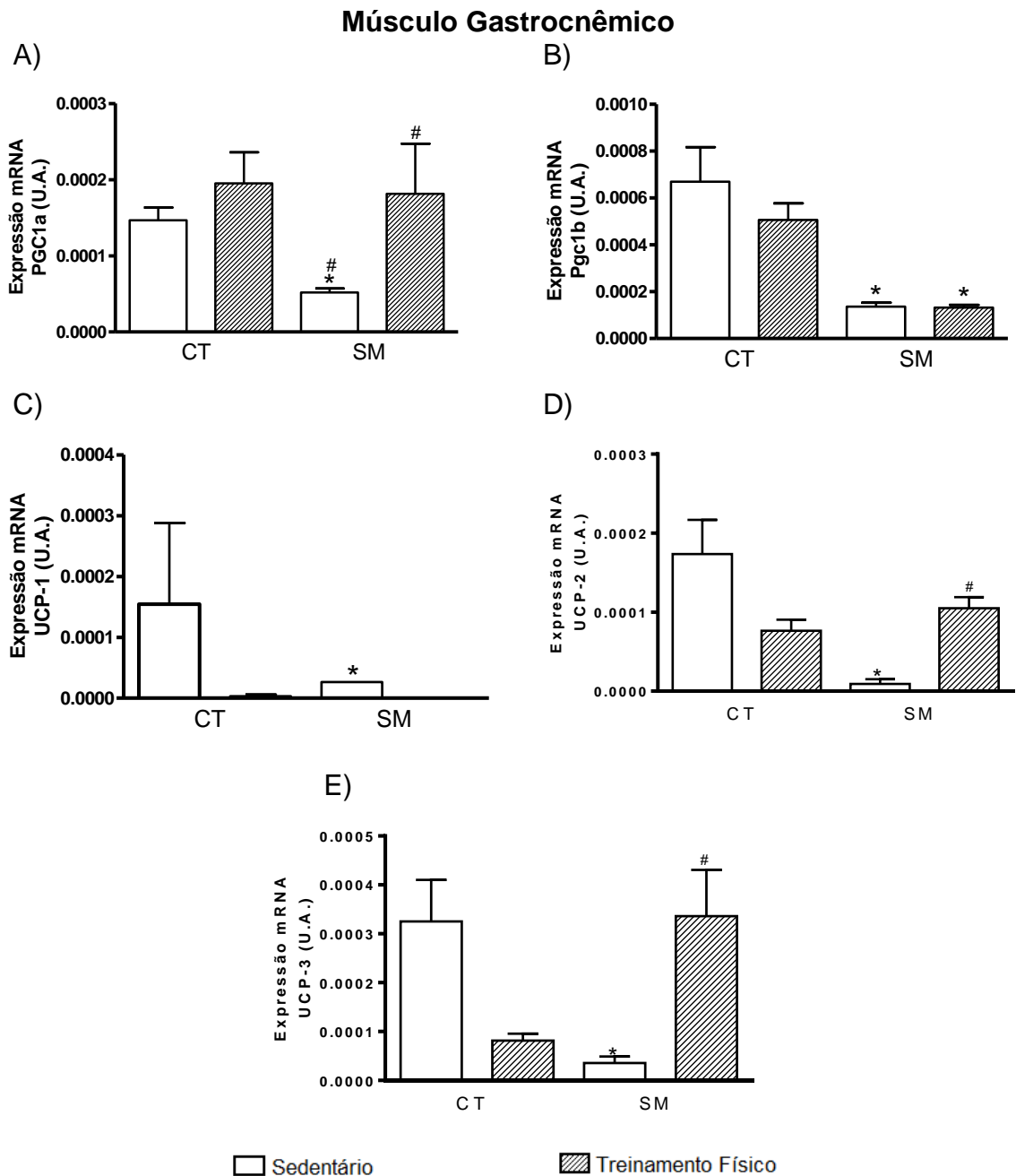


Figura 13: Avaliação através da técnica qRT-PCR unidade arbitrária (U.A.) PGC1α (Painel A), e PGC1β (Painel B) UCP-1 (Painel C), UCP-2 (Painel D) e UCP-3 (Painel E) de animais que receberam dieta controle (CT) ou hiperlipídica (SM) durante 13 semanas e foram mantidos sedentários (SED) ou submetidos ao treinamento físico de natação (TF) durante as últimas 6 semanas das dietas. \* $p < 0,05$  em comparação com os animais do grupo CT-SED. # $p < 0,05$  em relação ao grupo SM-SED (Anova One-way seguido de teste Bonferroni), valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. N=4

## **6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS**

Os ratos submetidos á dieta hiperlipídica e mantidos sedentários (SM-SED) apresentaram em comparação aos ratos submetidos à dieta controle e mantidos sedentários (CT-SED):

Aumento do lactato sanguíneo;

Aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca;

Aumento do depósito do tecido adiposo retroperitoneal;

Aumento do índice de adiposidade;

Aumento do peso corporal;

Aumento dos níveis de insulina, HOMA IR, HOMA  $\beta$ ;

Aumento da glicemia jejum;

Aumento do colesterol total;

Aumento da alamina aminotransferase;

Aumento da expressão gênica de leptina, resistina, adpsina, COX-2;

Redução da expressão gênica IR, IRS1, GLUT4, adiponectina.

Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ao treinamento físico (SM-TF), apresentaram em comparação aos ratos submetidos à dieta hiperlipídica e mantidos sedentários (SM-SED):

Redução dos níveis de lactato sanguíneo;

Redução da pressão arterial e frequência cardíaca;

Redução do peso corporal;

Aumento do peso do ventrículo esquerdo, do músculo gastrocnêmico;

Melhora da sensibilidade da insulina;

Níveis de glicemia jejum, colesterol total similares aos CT-SED e SM-SED;

Reversão dos prejuízos na via de sinalização da insulina (IR, IRS, GLUT4);

Correção do aumento da expressão das adipocinas pró-inflamatórias (leptina, resistina, adiposina e COX-2);

Normalização da expressão de TNF $\alpha$ ;

Aumento da expressão do receptor de adiponectina 1 no tecido adiposo retroperitoneal;

Aumento do depósito do TAM e a expressão gênica de GLUT4, AKT, UCP-1 e PPAR $\gamma$ 2; manteve a expressão gênica do IR, IRS-1, IRS-2 e diminuição da expressão gênica de leptina e TNF- $\alpha$  do tecido adiposo marrom;

No músculo gastrocnêmico aumento da expressão gênica do PGC-1 $\alpha$  e da UCP-3 e diminuição da expressão gênica de PGC-1 $\beta$ , UCP-1 e UCP-2.

## 7 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo, em síntese, mostram que a dieta hiperlipídica submetida aos ratos, logo após o desmame, por 13 semanas induziu aumento da pressão arterial média e frequência cardíaca, no depósito do tecido adiposo retroperitoneal, no índice de adiposidade, no peso corporal, nos níveis de insulina, HOMA IR, HOMA  $\beta$ , na glicemia de jejum, no colesterol total, na alanina aminotransferase, na expressão gênica da leptina, da resistina, da adiposina, da COX-2. Além de diminuir a expressão gênica do IR, IRS1, GLUT4 e adiponectina. Adicionalmente, mostramos que o treinamento físico durante as seis últimas semanas da dieta hiperlipídica, foi eficiente em atuar como tratamento, por restaurar vários parâmetros alterados pela dieta hiperlipídica, tais como: reduziu a pressão arterial média e frequência cardíaca; reduziu o depósito de tecido adiposo retroperitoneal, além de reduzir as expressões das adipocinas pró-inflamatórias e aumentar a expressão de genes da via de sinalização da insulina no tecido adiposo retroperitoneal. Além disso, o treinamento físico aumentou o depósito e a expressão gênica da UCP3 no músculo gastrocnêmico; aumentou o depósito e a expressão gênica da UCP-1 e reduziu a expressão das adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo marrom intraescapular. E ainda, o treinamento físico induziu redução do peso corporal, índice de adiposidade, redução nível de colesterol total e melhora da resistência à insulina nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

Apesar de haver um consenso na literatura de que modelos experimentais com dietas ricas em carboidratos ou hiperlipídicas melhor mimetizam as alterações da síndrome metabólica humana, esses modelos apresentam grande variabilidade na ocorrência dos distúrbios cardiometabólicos devido à grande variação na proporção e/ou nos tipos de nutrientes que compõem as dietas e/ ou devido as diferentes idades e/ ou modelos animais utilizados (Matveyenko *et al.*, 2009; Pereira-Lancha, Campos-Ferraz e Lancha, 2012; Silbernagel *et al.*, 2011; A Bakheet e M Attia, 2011). Dados do nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013) mostraram que dietas ricas em frutose e hiperlipídica induzem alterações metabólicas e acúmulo de gordura no fígado e rins dependentes da idade do rato. A dieta

hiperlipídica, para os ratos jovens (4 semanas de idade) e a dieta rica em frutose, para os ratos adultos (12 semanas de idade) são as intervenções nutricionais mais eficientes em induzir, em maior extensão, as alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas características da síndrome metabólica humana. Com base nesse estudo (De Castro *et al.*, 2013), optamos por utilizar a dieta hiperlipídica submetida a ratos, logo após o desmame, por 13 semanas.

Estudos da literatura (Garciaarena *et al.*, 2009; Moraes-Silva *et al.*, 2013) e de nosso laboratório (Soares *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2015) mostraram a eficiência do exercício aeróbico de baixa à moderada intensidade em promover adaptações fisiológicas e histológicas no sistema cardiovascular, tanto em áreas centrais de controle cardiovascular como em órgãos importantes do controle cardiovascular como o coração e rins. Também já é de consenso na literatura, a eficácia do exercício físico em reduzir o peso corporal (Botezelli *et al.*, 2010) através do aumento das taxas de triacilglicerol, mobilização e oxidação levando a redução de massa gorda (Sertié *et al.*, 2015). Durante o exercício físico, o músculo esquelético pode aumentar as suas despesas de energia em até 100 vezes (Botezelli *et al.*, 2010).

No presente estudo mostramos que o protocolo de treinamento físico utilizado foi eficiente na redução da frequência cardíaca e do lactato sanguíneo que são considerados marcadores de treinamento físico. Os mecanismos envolvidos na bradicardia de repouso, após treinamento físico crônico sofrem influência da modalidade física praticada. Na natação de baixa intensidade, a bradicardia está associada ao aumento do tônus vagal (Medeiros *et al.*, 2004). Quando é aumentada a intensidade do exercício de forma progressiva atinge-se uma intensidade na qual a concentração de lactato sanguíneo aumenta proporcionalmente devido a um incremento na contribuição anaeróbica para a ressíntese de ATP. Essa transição do metabolismo aeróbio/anaeróbio é conhecida como limiar anaeróbio (Voltarelli, Gobatto e De Mello, 2002). O limiar anaeróbico ou limiar de lactato tem sido atualmente, uma medida muito utilizada na avaliação da intensidade e efetividade do treinamento e da capacidade aeróbica de atletas de resistência (endurance) (Wasserman e Mcilroy, 1964) definiram o

termo limiar anaeróbico pela primeira vez como a mudança metabólica para o sistema anaeróbico em resposta ao aumento exponencial da concentração de CO<sub>2</sub> sanguíneo. O nível sanguíneo de lactato reflete o condicionamento físico do animal, quanto maior a capacidade de remover o lactato do sangue, maior o condicionamento físico (Pringle e Jones, 2002).

Avaliamos o efeito da natação sobre o lactato sanguíneo nos grupos experimentais, realizado após 6 semanas de treinamento ou sedentarismo. Os valores de lactato sanguíneo, observados no teste de lactato final, nos animais SM-SED foram maiores quando comparados aos animais CT-SED e SM-TF, sendo que o treinamento físico restaurou os níveis de lactato dos ratos SM-TF para níveis similares aos ratos CT-SED. O lactato sanguíneo dos animais CT-SED e CT-TF foram semelhantes entre si. E os animais SM-SED apresentaram maior nível de lactato sanguíneo, sugerindo um pior condicionamento físico por apresentar menor taxa de remoção de lactato do sangue. Ainda não é sabido se a resposta do lactato sanguíneo é sensível em identificar as adaptações sistêmicas e enzimáticas decorrentes da prática de natação regular em ratos com algum tipo de doença, principalmente metabólicas (Júnior, Neiva e Denadai, 2001). Porém, em nosso estudo a mensuração do nível do lactato foi eficiente em avaliar o condicionamento físico entre os ratos submetidos à dieta hiperlipídica (SM-SED e SM-TF).

No presente estudo os animais de todos os grupos (CT-SED, CT-TF, SM-SED e SM-TF) ingeriram a mesma quantidade calórica de dieta. Esse resultado pode ter favorecido a redução do tecido adiposo branco e conseqüentemente normalização da resistência á insulina, redução da adipocinas pró-inflamatórias, e recuperação da via de sinalização da insulina. Essa possibilidade, reforça se no fato de que os ratos SM-SED apresentaram aumento do peso corporal em relação aos ratos do grupo CT-SED e SM-TF, sendo que o peso dos ratos SM-TF foi igual aos ratos do grupo SM-SED.

Dados do presente estudo também mostraram que o treinamento físico impediu o aumento do peso corporal, índice de adiposidade e aumento do músculo gastrocnêmico. Esses dados estão de acordo com estudo de Xu e colaboradores (2011) que mostraram em camundongos com 4 semanas

de idade, submetidos à dieta hiperlipídica (42% de lipídeos) e ao treinamento físico (esteira, 15 m/min, 40 min/dia, 5 dias da semana por 8 semanas) apresentaram redução do peso corporal e do índice de adiposidade (Xu *et al.*, 2011). Em adição, Meek e colaboradores (2014) mostraram ratos que logo após o desmame foram submetidos à dieta ocidental (42% de lipídeo) e ao treinamento físico corrida voluntária por 60 dias apresentaram redução no índice de adiposidade quando comparado aos animais dieta controle sedentários (Meek *et al.*, 2014). Além disso, em nosso presente estudo, o treinamento físico induziu a hipertrofia muscular nos animais submetidos ao treinamento físico (CT-TF e SM-TF). De acordo Soffie e colaboradores (2016) camundongos jovens submetidos ao treinamento de resistência (10 semanas) apresentaram aumento no peso do músculo gastrocnêmico (Soffie *et al.*, 2016).

Já está bem estabelecido na literatura que o treinamento físico leva a uma redução na pressão arterial média de repouso. No entanto, essa redução tem se mostrado principalmente em indivíduos ou animais com hipertensão (Soares *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2015). Em nosso estudo mostramos que os animais SM-TF apresentaram redução da pressão arterial média comparados aos animais SM-SED. Diversos estudos (Xiao *et al.*, 2016; Haarmann *et al.*, 2016), mostram que as reduções na pressão arterial após o treinamento físico são mediadas por adaptações estruturais e neurohumorais. Dentre estas adaptações, ocorre uma menor atividade nervosa simpática, associada com a redução nos níveis de noradrenalina plasmática (Lambert *et al.*, 2010). Reduções na pressão arterial após treinamento físico, também estão relacionadas a uma menor atividade do sistema renina angiotensina, com reduções nos níveis de renina, angiotensina II, aldosterona e vasopressina plasmática (Winkler *et al.*, 2016).

A hipertrofia cardíaca pode acontecer como uma resposta adaptativa fisiológica (exercício físico) ou patológica (doenças valvulares, hipertensão ou obesidade) ao aumento do trabalho cardíaco (Aksentijević *et al.*, 2010). Durante o exercício físico o aumento metabólico induz um aumento do débito cardíaco levando ao incremento da pressão arterial, frequência cardíaca, contratilidade do miocárdio e aumento da resistência periférica



total. Em logo prazo, o exercício físico melhora a função cardíaca por alterar o fenótipo celular e molecular dos miócitos cardíacos, incluindo alterações adaptativas no tamanho da célula, função contrátil e resistência para alterações metabólicas (Kienesberger *et al.*, 2013). No presente estudo, o tratamento com treinamento físico por seis semanas impediu o aumento da pressão arterial média e aumentou o peso do ventrículo esquerdo em ratos que receberam a dieta hiperlipídica.

Hafstad e colaboradores (2013) mostraram que camundongos com 5-6 semanas de idade que foram induzidos a obesidade, por 9 semanas, através da dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) e no período de treinamento físico (esteira, 25% de inclinação/ 5 dias da semana/ 8-10 semanas) a quantidade de lipídeos da dieta foi reduzida (35% de lipídeos) (Hafstad *et al.*, 2013). Os resultados desse estudo mostraram que o treinamento físico melhorou a função diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo. Em outros estudos (Soares *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2015) (Maia *et al.*, 2015), mostramos que o treinamento físico (natação 1 hora/ dia/ 5 dias na semana/ 4-5 semanas) induz hipertrofia excêntrica, reduziu o processo inflamatório e a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Dados anteriores de nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013) mostraram que ratos submetidos ao consumo de dietas ricas em frutose e dieta hiperlipídica (12 e 4 semanas de idade respectivamente) sofrem distúrbios metabólicos como aumento do colesterol total e/ou frações e aumento da alanina aminotransferase, associado a alterações histológicas hepáticas como esteatose e presença de processos inflamatórios (De Castro *et al.*, 2013). No presente estudo mostramos que a dieta hiperlipídica produz aumento do colesterol total e da alanina aminotransferase. O treinamento físico foi capaz de reverter essas alterações. Esses dados estão de acordo com o estudo de Speretta e colaboradores (2012) que mostraram que ratos Wistar com 90 dias de idade receberam dieta hiperlipídica e foram submetidos ao treinamento físico (natação 60 min/dia, 5 dias por semana, no período de 8 semanas) apresentaram uma redução nos níveis de colesterol total e triglicérides em relação aos animais SM-SED (Speretta *et al.*, 2012). Em adição, estudo de Cho e colaboradores (2014) em camundongos com 5

meses de idade, alimentados com dieta hiperlipídica por 23 semanas e submetidos, a partir da 16ª semana, ao treinamento físico (corrida em esteira, por 5 min, 8 m/min, em seguida 45 min, 10 m/min, inclinação de 5° e nos 5 minutos finais a uma velocidade de 8 m/min, totalizando a sessão com duração de 55 min, 5 vezes por semana), apresentaram uma redução nos níveis de alanina aminotransferase em comparação aos animais SM-SED (Cho *et al.*, 2014).

A resistência à insulina é definida como a diminuição da capacidade de tecidos para responder à ação da insulina (Dominici e cols, 2014) (Dominici *et al.*, 2014). Nossos dados mostraram que animais treinados tiveram uma redução no HOMA IR e estão de acordo com estudos de Lloyd e colaboradores (2014) que mostraram ratos alimentados com dieta hiperlipídica (por 9 semanas) e submetidos ao treinamento físico (esteira 11 m/min durante 30 min, 3 x / semana por 12 semanas) reduziram o HOMA-IR quando comparados aos animais dieta hiperlipídica sedentários (Lloyd *et al.*, 2015). Similarmente, estudos de Marinho e colaboradores (2014) mostraram que camundongos Swiss com seis semanas de idade, submetidos à dieta hiperlipídica por período de 12 semanas e submetidos ao treinamento físico (natação, 1 hora ao dia com ou sem sobrecarga de 5% da massa corporal) melhoraram a sensibilidade à insulina (Marinho *et al.*, 2014). Em adição, Griffin e colaboradores (2012) mostraram que camundongos com 12 semanas de idade receberam dieta hiperlipídica (60% kcal de gordura, por 12 semanas), na 8ª semana os animais foram colocados em rodas voluntárias e esses animais apresentaram redução na resistência a insulina e na intolerância a glicose.

Vários estudos (Marcinko *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) têm mostrado uma clara ligação entre as vias de sinalização que mediam as ações da insulina e o treinamento físico. A ativação da sinalização da insulina se inicia com a ligação da insulina ao seu receptor na membrana celular, induzindo a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), proteínas que estão associadas com a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e posteriormente da AKT. A subunidade do receptor, IRS-1, é fosforilado pelo receptor da insulina, que por sua vez fosforila PI3K que fosforila AKT. Estes eventos de sinalização resultam na

translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, que induz o aumento na captação de glicose no adipócito. Nos últimos anos, uma série de estudos tem revelado uma clara ligação entre as vias de transdução de sinal que medeiam às ações da insulina e as alterações metabólicas no tecido adiposo branco (Fuentes *et al.*, 2013; Rask-Madsen e King, 2013; Cao, 2014; Trayhurn e Alomar, 2015). Nossos dados mostraram que o treinamento físico aumentou a expressão de genes da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco. Farias e colaboradores (2012) mostraram em camundongos, 2 meses de idade, submetidos simultaneamente a dieta hiperlipídica e ao treinamento físico natação (30 minutos com intervalo de 5 min entre as sessões, 5 dias por semana por doze semanas) redução da expressão de IR e IRS-1 no tecido adiposo marrom, fígado e músculo gastrocnêmico (Farias *et al.*, 2012). Mardare e colaboradores (2016) mostraram que camundongos, com 10 semanas de idade, tratados com dieta hiperlipídica por 14 semanas, submetidos ao TF de força iniciado na 5ª semana (5 vezes na semana, durante 3 min, em 3 séries), apresentaram redução nos níveis da intolerância a glicose e aumento no nível da expressão gênica de GLUT4 (Mardare *et al.*, 2016).

Nossos dados, juntamente com os da literatura, fornecem fortes evidências de que o treinamento físico possa modular beneficemente diferentes componentes da via de sinalização da insulina nos principais órgãos dependentes dela, o que reverte ou atenua diversos distúrbios sistêmicos como a hiperglicemia, hiperinsulinemia, redução da captação de glicose e da sensibilidade da insulina, produzindo uma melhora geral do perfil metabólico em doenças como diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.

No presente estudo o treinamento físico, no grupo SM-TF, apresentou-se como importante indutor de processo anti-inflamatório, na medida em que normalizou o aumento da expressão gênica de leptina, da resistina, da COX-2 e do TNF- $\alpha$  no tecido adiposo retroperitoneal e normalizou a elevação da leptina e do TNF- $\alpha$  no tecido adiposo marrom quando comparado ao grupo SM-SED. Esses resultados contribuem para a redução de distúrbios metabólicos secundários a inflamação crônica do tecido adiposo branco induzido pela dieta hiperlipídica. Esses dados mostram a ação anti-inflamatória induzida pelo treinamento físico e

corroboram com o trabalho de Linden e colaboradores (2014) que mostraram que camundongos com 4 semanas de idade que receberam dieta hiperlipídica com 60% de lipídeos e foram submetidos ao treinamento físico corrida em esteira (5 dias/ semana a 12 m/min, 8% de inclinação, 40 min/dia) apresentaram redução na expressão gênica da leptina e do TNF- $\alpha$  (Linden *et al.*, 2014). Em adição, Marcinko e colaboradores (2015) mostraram em camundongos obesos nocaute serina-alanina com mutações nos locais de fosforilação AMPK, com 6, 8 e 12 semanas de idade, alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico corrida em esteira (4 séries de 22 m/min por 15 min com descanso de 2 minutos, 3 vezes por semana) por mais seis semanas que ao final do experimento os animais treinados apresentaram redução no nível da expressão gênica da leptina (Marcinko *et al.*, 2015). Em adição, Cho e colaboradores (2016) mostraram que camundongos com 4 semanas de idade, alimentados com dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) por 23 semanas, sendo que a partir da 15ª semana foram submetidos ao TF (esteira 5 min a 8 m/min com intervalos de 1 min a 17 m/min por 5 dias por semana), aumentou a expressão gênica do receptor 1 da adiponectina (Cho *et al.*, 2016).

É amplamente aceito que o tecido adiposo marrom é a principal fonte de termogênese adaptativa em mamíferos normotérmicos modernos. O depósito de tecido adiposo marrom intraescapular foi sugerido como o depósito mais significativo, uma vez que transporta sangue aquecido através da veia da *Sulzer* para o coração, permitindo uma boa distribuição de calor a outras partes do corpo. A atividade do tecido adiposo marrom é controlada principalmente pelo sistema nervoso central, que induz a liberação de noradrenalina a partir de sinapses do sistema nervoso simpático após estímulo frio (Ryu *et al.*, 2015) A exposição a temperaturas baixas ou ingestão de alimentos, ativa o sistema nervoso simpático. Durante o treinamento físico ocorre ativação do sistema nervoso simpático e liberação de catecolaminas (Contreras *et al.*, 2015). A estimulação do sistema nervoso simpático pelo treinamento físico pode promover efeitos sobre o tecido adiposo marrom tanto de forma aguda (lipólise e ativação de UCP-1) como de forma crônica (transcrição do gene da UCP-1, biogênese mitocondrial,

hiperplasia do tecido adiposo marrom, recrutamento de adipócitos marrons em tecido adiposo branco) (Ruiz *et al.*, 2015).

Estudos de (Navarro-Alarcón *et al.*, 2014) evidenciam que tanto PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  quanto as UCPs, possuem um papel fundamental em processos metabólicos mediados pelas mitocôndrias. Em algumas situações fisiológicas, observa-se que o PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  promovem um aumento da expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial, na função respiratória, na homeostase energética e na produção de espécies reativas de oxigênio, causando aumento da capacidade enzimática para beta oxidação de ácidos graxos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Palomer *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). O aumento da expressão de PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  foram observados em situações onde há demanda energética, como durante o treinamento físico (Ihsan *et al.*, 2015) ou em situações em que há necessidade de produzir calor. Em adição, um estudo (Villarroya, Iglesias e Giralt, 2007) mostrou que ambos PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  agem em conjunto com o mais recente membro da mesma família descoberto, o coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma (Pprc-1 $\gamma$ ) na proteção de alguns modelos animais contra a obesidade induzida pela dieta. A via metabólica do PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  na musculatura esquelética e no tecido adiposo marrom envolvem, ainda, as UCPs, que participam da termogênese adaptativa via oxidação de lipídeos e desacoplamento da cadeia respiratória, produzindo e dissipando calor em resposta a variação do tipo e quantidade de macronutrientes da dieta (Seale *et al.*, 2011).

Nossos dados, do presente estudo, mostraram que o treinamento físico não induziu diferença na temperatura corporal dos animais e ainda aumentou o depósito, a expressão gênica do PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , UCP-1 no do tecido adiposo marrom e aumentou a expressão gênica do PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$ , UCP-2 e UCP-3 no músculo gastrocnêmico. Esses dados em conjunto mostram que o treinamento físico aumenta da atividade mitocondrial e conseqüentemente a termogênese, apesar de não haver aumento da temperatura corporal, contribuindo para melhora metabólica nos animais SM-TF. A UCP-2 e a UCP-3 são também responsáveis pelo desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial (Liu *et al.*, 2013). Ao contrário da UCP-1,

UCP2 não é aumentada pela exposição ao frio, mas sua expressão gênica é sensível a fatores nutricionais, tais como teor elevado de gordura (He *et al.*, 2016). Estudos recentes têm mostrado a presença de células chamadas “células beges” no tecido adiposo branco em roedores e seres humanos (Cao, 2014). As “células beges” possuem uma morfologia multilocular, muitas mitocôndrias e expressam a UCP-1 (Cao, 2014). Essas células apresentam características dos tecidos adiposos branco e marrom e é regulado por diversos fatores em uma glândula endócrina, parácrina e forma autócrina. O ocorrência destas células está associado com resistência a insulina, diabetes tipo 2 e outras doenças metabólicas. O treinamento físico pode ativar e recrutar tecido adiposo marrom através da ativação do sistema nervoso simpático, coração e músculo esquelético (Sanchez-Delgado *et al.*, 2015). De fato, Wu e colaboradores (2014) mostraram em ratos Wistar, pesando 200 g, submetidos à dieta hiperlipídica (20% de lipídeos) e ao treinamento físico esteira (inclinação de 10% e velocidade 30 m/min 1 hora/dia, 5 dias/ semana, por 8 semanas) apresentaram aumento do depósito do tecido adiposo marrom, aumento da PGC-1 $\alpha$ , UCP1 e redução do depósito de tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e epididimal (Wu *et al.*, 2014).

De acordo com nossos resultados podemos sugerir que os animais SM-TF reduziram a taxa metabólica basal, o depósito do tecido adiposo branco retroperitoneal, que por sua vez, reduziu as expressões gênicas das adipocinas pró-inflamatórias, promovendo a normalização da via de sinalização da insulina e melhorando a sensibilidade á insulina, que reduziu os níveis de triglicérides. Por outro lado o treinamento físico aumentou o depósito do tecido adiposo marrom intraescapular, as expressões gênicas da UCP-1 e da PGC1- $\alpha$  e aumentou o depósito e a expressão da UCP-3 no músculo gastrocnêmico.

## **8 CONCLUSÃO**

Os resultados mostraram que ratos submetidos ao treinamento físico (SM-TF) apresentaram redução do peso corporal, índice de adiposidade, ALT, resistência a insulina, da expressão gênica das adipocinas pró-inflamatórias e aumento das expressões de genes da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco, aumento da UCP-1, PPAR $\gamma$ 2 no tecido adiposo marrom e aumentou a expressão gênica PGC1- $\alpha$ , UCP-2 e UCP-3 no músculo gastrocnêmico quando comparados ao animais SM-SED. Sumarizando, o treinamento físico foi eficiente como tratamento por restaurar várias alterações induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos.

## 9 REFERÊNCIAS

A BAKHEET, S.; M ATTIA, S. Evaluation of chromosomal instability in diabetic rats treated with naringin. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2011, p. 365292, 2011. ISSN 1942-0994.

ADEOYE, A. M. et al. Excess Metabolic Syndrome Risks Among Women Health Workers Compared With Men. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, v. 17, n. 11, p. 880-4, Nov 2015. ISSN 1751-7176

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, v. 11, n. 8, p. 327-32, Oct 2000. ISSN 1043-2760.

AKSENTIJEVIĆ, D. et al. High-energy phosphotransfer in the failing mouse heart: role of adenylate kinase and glycolytic enzymes. *Eur J Heart Fail*, v. 12, n. 12, p. 1282-9, Dec 2010. ISSN 1879-0844.

ALOSCO, M. L. et al. Obesity and cognitive dysfunction in heart failure: the role of hypertension, type 2 diabetes, and physical fitness. *Eur J Cardiovasc Nurs*, v. 14, n. 4, p. 334-41, Aug 2015. ISSN 1873-1953.

BADMAN, M. K.; FLIER, J. S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*, v. 307, n. 5717, p. 1909-14, Mar 25 2005. ISSN 1095-9203

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, v. 2010, p. 802078, 2010. ISSN 1466-1861

BARTNESS, T. J.; VAUGHAN, C. H.; SONG, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, v. 34 Suppl 1, p. S36-42, Oct 2010. ISSN 1476-5497.

BEAZLEY, K. E. et al. Two sides of MGP null arterial disease: chondrogenic lesions dependent on transglutaminase 2 and elastin fragmentation associated with induction of adipsin. *J Biol Chem*, v. 288, n. 43, p. 31400-8, Oct 25 2013. ISSN 1083-351X



BERGER, A. et al. Epidermal anti-Inflammatory properties of 5,11,14 20:3: effects on mouse ear edema, PGE2 levels in cultured keratinocytes, and PPAR activation. *Lipids Health Dis*, v. 1, p. 5, Dec 6 2002. ISSN 1476-511X

BJØRNDAL, B. et al. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes*, v. 2011, p. 490650, 2011. ISSN 2090-0716.

BOTEZELLI, J. D. et al. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *Lipids Health Dis*, v. 9, p. 116, 2010. ISSN 1476-511X.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004. ISSN 0031-9333.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol*, v. 220, n. 2, p. T47-59, Feb 2014. ISSN 1479-6805.

CAPONI, P. W. et al. Aerobic exercise training induces metabolic benefits in rats with metabolic syndrome independent of dietary changes. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 68, n. 7, p. 1010-7, Jul 2013. ISSN 1980-5322.

CASTRO, E. F. et al. Exercise training prevents increased intraocular pressure and sympathetic vascular modulation in an experimental model of metabolic syndrome. *Braz J Med Biol Res*, v. 48, n. 4, p. 332-8, Apr 2015. ISSN 1414-431X.

CHO, J. et al. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. *J Exerc Nutrition Biochem*, v. 18, n. 4, p. 339-46, Dec 2014. ISSN 2233-6834.

CHO, J. K. et al. Exercise Training Improves Whole Body Insulin Resistance via Adiponectin Receptor 1. *Int J Sports Med*, Jan 2016. ISSN 1439-3964.

CIANFLONE, K. Acylation stimulating protein and triacylglycerol synthesis: potential drug targets? *Curr Pharm Des*, v. 9, n. 17, p. 1397-410, 2003. ISSN 1381-6128

CINTI, S. Adipose tissues and obesity. *Ital J Anat Embryol*, v. 104, n. 2, p. 37-51, Apr-Jun 1999. ISSN 1122-6714

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, v. 46, n. 11, p. 2347-55, Nov 2005. ISSN 0022-2275

COLLINS, S.; YEHUDA-SHNAIDMAN, E.; WANG, H. Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of  $\beta$ -adrenergic signaling networks. *Int J Obes (Lond)*, v. 34 Suppl 1, p. S28-33, Oct 2010. ISSN 1476-5497.

CONTRERAS, C. et al. The brain and brown fat. *Ann Med*, v. 47, n. 2, p. 150-68, Mar 2015. ISSN 1365-2060.

COPPARI, R.; BJØRBÆK, C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, v. 11, n. 9, p. 692-708, Sep 2012. ISSN 1474-1784.

DE CASTRO, U. G. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis*, v. 12, p. 136, 2013. ISSN 1476-511X.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*, v. 54, n. 6, p. 945-55, 2008. ISSN 0009-9147

DOMINICI, F. P. et al. Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). *Clin Sci (Lond)*, v. 126, n. 9, p. 613-30, May 2014. ISSN 1470-8736.

DUCY, P. et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, v. 100, n. 2, p. 197-207, Jan 21 2000. ISSN 0092-8674

ENGSTROM, G. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*, v. 52, n. 8, p. 2097-101, 2003. ISSN 0012-1797

ERIKSSON, J.; TAIMELA, S.; KOIVISTO, V. A. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia*, v. 40, n. 2, p. 125-35, Feb 1997. ISSN 0012-186X.

ESPINOZA, D. O. et al. Dual modulation of both lipid oxidation and synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in cultured myotubes. *FASEB J*, v. 24, n. 4, p. 1003-14, Apr 2010. ISSN 1530-6860

FANTUZZI, G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol*, v. 121, n. 2, p. 326-30, Feb 2008. ISSN 1097-6825

FARHANGI, M. A. et al. Association between dietary patterns and metabolic syndrome in a sample of Tehranian adults. *Obes Res Clin Pract*, Jun 10 2015. ISSN 1871-403X

FARIAS, J. M. et al. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. *Lipids Health Dis*, v. 11, p. 134, 2012. ISSN 1476-511X.

FOURNIER, S. B. et al. Improved arterial-ventricular coupling in metabolic syndrome after exercise training: a pilot study. *Med Sci Sports Exerc*, v. 47, n. 1, p. 2-11, Jan 2015. ISSN 1530-0315.

FRONTINI, A.; CINTI, S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*, v. 11, n. 4, p. 253-6, Apr 7 2010. ISSN 1932-7420

FRUHBECK, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*, v. 456, p. 1-22, 2008. ISSN 1064-3745

FRUHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 280, n. 6, p. E827-47, Jun 2001. ISSN 0193-1849

FUENTES, E. et al. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 136584, 2013. ISSN 1466-1861.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, v. 316, n. 2, p. 129-39, 2010. ISSN 1872-8057

GARCIARENA, C. D. et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, v. 53, n. 4, p. 708-14, Apr 2009. ISSN 1524-4563.

GIORDANO, A. et al. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*, v. 170, n. 5, p. R159-71, May 2014. ISSN 1479-683X.

GOESSLER, K. F. et al. Direct renin inhibitor therapy and swimming training: hemodynamic and cardiac effects in hypertensive and normotensive rats. *Clin Exp Hypertens*, v. 37, n. 4, p. 345-52, 2015. ISSN 1525-6006.

GOLLISCH, K. S. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 297, n. 2, p. E495-504, Aug 2009. ISSN 1522-1555

GOODPASTER, B. H.; THAETE, F. L.; KELLEY, D. E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, v. 71, n. 4, p. 885-92, Apr 2000. ISSN 0002-9165

HAARMANN, H. et al. Sympathetic Activation is Associated with Exercise Limitation in COPD. *COPD*, p. 1-6, Feb 2016. ISSN 1541-2563.

HAFSTAD, A. D. et al. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes*, v. 62, n. 7, p. 2287-94, Jul 2013. ISSN 1939-327X.

HE, K. et al. Hypolipidemic Effects of Alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters. *Planta Med*, Feb 2016. ISSN 1439-0221.

HENAGAN, T. M. et al. Dietary quercetin supplementation in mice increases skeletal muscle PGC1 $\alpha$  expression, improves mitochondrial function and attenuates insulin resistance in a time-specific manner. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e89365, 2014. ISSN 1932-6203.

HILLEBRAND, J. J.; DE WIED, D.; ADAN, R. A. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, v. 23, n. 12, p. 2283-306, Dec 2002. ISSN 0196-9781

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 27 Suppl 3, p. S53-5, Dec 2003.

HOTTA, K.; HIRSHMAN, C. A.; EMALA, C. W. TNF-alpha increases transcription of Galpha(i-2) in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 279, n. 2, p. L319-25, Aug 2000. ISSN 1040-0605

HSIEH, P. S. et al. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring)*, v. 17, n. 6, p. 1150-7, Jun 2009. ISSN 1930-7381

HUANG, P. L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab*, v. 20, n. 6, p. 295-302, Aug 2009. ISSN 1879-3061

IHSAN, M. et al. Regular postexercise cooling enhances mitochondrial biogenesis through AMPK and p38 MAPK in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 309, n. 3, p. R286-94, Aug 2015. ISSN 1522-1490.

JIA, J. J. et al. The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Mol Biol Rep*, v. 37, n. 3, p. 1513-22, Mar 2010. ISSN 1573-4978.

JÚNIOR, P. B.; NEIVA, C. M.; DENADAI, B. S. Effect of an acute beta-adrenergic blockade on the blood glucose response during lactate minimum test. *J Sci Med Sport*, v. 4, n. 3, p. 257-65, Sep 2001. ISSN 1440-2440.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr*, v. 2, n. 4, p. 304-16, Jul 2011. ISSN 2156-5376.

KANG, C. et al. PGC-1 $\alpha$  overexpression by in vivo transfection attenuates mitochondrial deterioration of skeletal muscle caused by immobilization. *FASEB J*, v. 29, n. 10, p. 4092-106, Oct 2015. ISSN 1530-6860.

KARJALAINEN, J. J. et al. Effects of physical activity and exercise training on cardiovascular risk in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 38, n. 4, p. 706-15, Apr 2015. ISSN 1935-5548.

KAZAK, L. et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell*, v. 163, n. 3, p. 643-55, Oct 2015. ISSN 1097-4172.

KIENESBERGER, P. C. et al. Early structural and metabolic cardiac remodelling in response to inducible adipose triglyceride lipase ablation. *Cardiovasc Res*, v. 99, n. 3, p. 442-51, Aug 2013. ISSN 1755-3245.

KRAUSS, S.; ZHANG, C. Y.; LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, n. 3, p. 248-61, Mar 2005. ISSN 1471-0072.

KRYSIAK, R.; OKOPIEN, B.; HERMAN, Z. S. [Adipose tissue: a new endocrine organ]. *Przegl Lek*, v. 62, n. 9, p. 919-23, 2005. ISSN 0033-2240

KWON, O. et al. Clinical significance of insulin-like growth factor gene polymorphisms with survival in patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Korean Surg Soc*, v. 82, n. 5, p. 288-95, May 2012. ISSN 2093-0488

LAGO, F. et al. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*, v. 3, n. 12, p. 716-24, 2007. ISSN 1745-8390

LAMBERT, G. W. et al. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome--causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*, v. 126, n. 2, p. 159-72, May 2010. ISSN 1879-016X.

LESSIANI, G. et al. Arterial stiffness and sedentary lifestyle: Role of oxidative stress. *Vascul Pharmacol*, Jun 2015. ISSN 1879-3649.

LEVIN, B. E. Intracarotid glucose induced norepinephrine response and the development of diet induced obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 16, n. 6, p. 451-7, Jun 1992.

LI, G. G. et al. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. *Gen Comp Endocrinol*, v. 166, n. 1, p. 117-27, Mar 2010. ISSN 1095-6840.

LINDEN, M. A. et al. Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to high-fat feeding. *Physiol Rep*, v. 2, n. 7, 2014. ISSN 2051-817X.

LIU, J. et al. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res*, v. 2013, p. 585897, 2013. ISSN 2314-6745.

LLOYD, J. W. et al. Diet-induced increases in chemerin are attenuated by exercise and mediate the effect of diet on insulin and HOMA-IR. *Ther Adv Endocrinol Metab*, v. 6, n. 5, p. 189-98, Oct 2015. ISSN 2042-0188.

LO, J. C. et al. Adipsin is an adipokine that improves beta cell function in diabetes. *Cell*, v. 158, n. 1, p. 41-53, Jul 3 2014. ISSN 1097-4172

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 652-60, Apr 2000. ISSN 0028-0836.

MACHADO, M. V. et al. Physical exercise restores microvascular function in obese rats with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*, v. 12, n. 9, p. 484-92, Nov 2014. ISSN 1557-8518.

MAIA, R. C. et al. Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 48, n. 11, p. 1010-22, Nov 2015. ISSN 1414-431X.

MAMANE, Y. et al. The C3a anaphylatoxin receptor is a key mediator of insulin resistance and functions by modulating adipose tissue macrophage infiltration and activation. *Diabetes*, v. 58, n. 9, p. 2006-17, Sep 2009. ISSN 1939-327X

MARCINKO, K. et al. The AMPK activator R419 improves exercise capacity and skeletal muscle insulin sensitivity in obese mice. *Mol Metab*, v. 4, n. 9, p. 643-51, Sep 2015. ISSN 2212-8778.

MARDARE, C. et al. Endurance and Resistance Training Affect High Fat Diet-Induced Increase of Ceramides, Inflammasome Expression, and Systemic Inflammation in Mice. *J Diabetes Res*, v. 2016, p. 4536470, 2016. ISSN 2314-6753.

MARINHO, R. et al. Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. *Einstein (Sao Paulo)*, v. 12, n. 1, p. 82-9, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2317-6385.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, v. 28, n. 7, p. 412-9, Jul 1985. ISSN 0012-186X.

MATVEYENKO, A. V. et al. Successful versus failed adaptation to high-fat diet-induced insulin resistance: the role of IAPP-induced beta-cell endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*, v. 58, n. 4, p. 906-16, Apr 2009. ISSN 1939-327X.

MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 37, n. 12, p. 1909-17, Dec 2004. ISSN 0100-879X.

MEEK, T. H. et al. Effects of early-life exposure to Western diet and wheel access on metabolic syndrome profiles in mice bred for high voluntary exercise. *Genes Brain Behav*, v. 13, n. 3, p. 322-32, Mar 2014. ISSN 1601-183X.

MORAES-SILVA, I. C. et al. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. *J Appl Physiol (1985)*, v. 114, n. 6, p. 786-91, Mar 2013. ISSN 1522-1601.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab*, v. 19, n. 5, p. 741-56, May 2014. ISSN 1932-7420.



MORVAN, E. et al. Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model. *Cardiovasc Diabetol*, v. 12, p. 89, 2013. ISSN 1475-2840.

MOSTARDA, C. et al. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 67, n. 7, p. 815-20, Jul 2012. ISSN 1980-5322.

NAGAEV, I. et al. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PLoS One*, v. 1, p. e31, 2006. ISSN 1932-6203

NAN, Y. M. et al. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol*, v. 44, n. 3, p. 358-65, 2009. ISSN 1502-7708.

NAVARRO-ALARCÓN, M. et al. Melatonin and metabolic regulation: a review. *Food Funct*, v. 5, n. 11, p. 2806-32, Nov 2014. ISSN 2042-650X.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci*, v. 110, n. 3, p. 267-78, 2006. ISSN 0143-5221

OLLER, D. W.; UDEKWU, P. O. Liver trauma: a victory for conservative approaches. *Curr Surg*, v. 61, n. 1, p. 21-4, Jan-Feb 2004. ISSN 0149-7944

OTERO, M. et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett*, v. 579, n. 2, p. 295-301, Jan 17 2005. ISSN 0014-5793

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, v. 100, n. 25, p. 2473-6, 1999. ISSN 0009-7322

\_\_\_\_\_. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, v. 103, n. 8, p. 1057-63, Feb 27 2001. ISSN 1524-4539

OUCHI, N.; WALSH, K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*, v. 380, n. 1-2, p. 24-30, May 1 2007. ISSN 0009-8981

PALOMER, X. et al. An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, v. 168, n. 4, p. 3160-72, Oct 2013. ISSN 1874-1754.

PANCHAL, S. K.; WARD, L.; BROWN, L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr*, v. 52, n. 2, p. 559-68, Mar 2013. ISSN 1436-6215.

PATEL, L. et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 300, n. 2, p. 472-6, Jan 10 2003. ISSN 0006-291X

PEDRERO-CHAMIZO, R. et al. Higher levels of physical fitness are associated with a reduced risk of suffering sarcopenic obesity and better perceived health among the elderly: the EXERNET multi-center study. *J Nutr Health Aging*, v. 19, n. 2, p. 211-7, Feb 2015.

PERAZELLA, M. A. COX-2 inhibitors and the kidney. *Hosp Pract (1995)*, v. 36, n. 3, p. 43-6, 55-6, Mar 15 2001. ISSN 2154-8331

PEREIRA-LANCHA, L. O.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHA, A. H. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes*, v. 5, p. 75-87, 2012. ISSN 1178-7007.

PLOMGAARD, P. et al. TNF-alpha, but not IL-6, stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in human subcutaneous adipose tissue. *J Appl Physiol (1985)*, v. 98, n. 6, p. 2019-23, Jun 2005. ISSN 8750-7587

PRINGLE, J. S.; JONES, A. M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. *Eur J Appl Physiol*, v. 88, n. 3, p. 214-26, Dec 2002. ISSN 1439-6319.

RASK-MADSEN, C.; KING, G. L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*, v. 17, n. 1, p. 20-33, Jan 2013. ISSN 1932-7420.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, v. 37, n. 12, p. 1595-607, Dec 1988. ISSN 0012-1797

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, May 1997. ISSN 0022-3166.

RODRÍGUEZ, A. et al. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 309, n. 8, p. E691-714, Oct 2015. ISSN 1522-1555.

ROUSSET, S. et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, v. 53 Suppl 1, p. S130-5, Feb 2004. ISSN 0012-1797.

RUIZ, J. R. et al. Regulation of energy balance by brown adipose tissue: at least three potential roles for physical activity. *Br J Sports Med*, v. 49, n. 15, p. 972-3, Aug 2015. ISSN 1473-0480.

RYDEN, A. et al. A comparative controlled study of personality in severe obesity: a 2-y follow-up after intervention. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 28, n. 11, p. 1485-93, Nov 2004.

RYU, V. et al. Brown adipose tissue has sympathetic-sensory feedback circuits. *J Neurosci*, v. 35, n. 5, p. 2181-90, Feb 2015. ISSN 1529-2401.

SALONEN, M. K. et al. Physical activity, body composition and metabolic syndrome in young adults. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0126737, 2015. ISSN 1932-6203.

SANCHEZ-DELGADO, M. et al. Absence of Maternal Methylation in Biparental Hydatidiform Moles from Women with NLRP7 Maternal-Effect Mutations Reveals Widespread Placenta-Specific Imprinting. *PLoS Genet*, v. 11, n. 11, p. e1005644, Nov 2015. ISSN 1553-7404.

SAVAGE, D. B. et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*, v. 50, n. 10, p. 2199-202, Oct 2001. ISSN 0012-1797 (

SEALE, P. et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*, v. 121, n. 1, p. 96-105, Jan 2011. ISSN 1558-8238.

SERTIÉ, R. A. et al. Fat gain with physical detraining is correlated with increased glucose transport and oxidation in periepididymal white adipose tissue in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 48, n. 7, p. 650-3, Jul 2015. ISSN 1414-431X.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, v. 10, n. 1, p. 19-29, Feb 1999. ISSN 1084-9521

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*, v. 48, n. 6, p. 1253-62, Jun 2007. ISSN 0022-2275.

SHAH, R. V. et al. Visceral adiposity and the risk of metabolic syndrome across body mass index: the MESA Study. *JACC Cardiovasc Imaging*, v. 7, n. 12, p. 1221-35, Dec 2014.

SHARMA, N. et al. Mechanisms for independent and combined effects of calorie restriction and acute exercise on insulin-stimulated glucose uptake by skeletal muscle of old rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 308, n. 7, p. E603-12, Apr 2015. ISSN 1522-1555.

SILBERNAGEL, G. et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: an exploratory trial. *Br J Nutr*, v. 106, n. 1, p. 79-86, Jul 2011. ISSN 1475-2662.

SOARES, E. R. et al. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n. 6, p. 573-82, Jun 2011. ISSN 1414-431X.

SOFFE, Z. et al. Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand J Med Sci Sports*, v. 26, n. 2, p. 172-88, Feb 2016. ISSN 1600-0838.

SOUSA, L. E. et al. Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. *Free Radic Res*, v. 49, n. 11, p. 1335-43, 2015. ISSN 1029-2470.

SOYAL, S. et al. PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia*, v. 49, n. 7, p. 1477-88, Jul 2006. ISSN 0012-186X.

SPERETTA, G. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 67, n. 12, p. 1469-77, Dec 2012. ISSN 1980-5322.

STEFFENS, S.; MACH, F. Adiponectin and adaptive immunity: linking the bridge from obesity to atherogenesis. *Circ Res*, v. 102, n. 2, p. 140-2, Feb 1 2008. ISSN 1524-4571

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 307-12, 2001. ISSN 0028-0836

TAKEISHI, Y. et al. Serum resistin is associated with high risk in patients with congestive heart failure--a novel link between metabolic signals and heart failure. *Circ J*, v. 71, n. 4, p. 460-4, 2007. ISSN 1346-9843

TANTINI, B. et al. NF-kappaB and ERK cooperate to stimulate DNA synthesis by inducing ornithine decarboxylase and nitric oxide synthase in cardiomyocytes treated with TNF and LPS. *FEBS Lett*, v. 512, n. 1-3, p. 75-9, Feb 13 2002. ISSN 0014-5793

TERAUCHI, Y.; KADOWAKI, T. [PPAR and diabetes]. *Nihon Rinsho*, v. 63, n. 4, p. 623-9, Apr 2005. ISSN 0047-1852

TOUATI, S. et al. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*, v. 43, n. 3, p. 398-407, Mar 2011. ISSN 1530-0315.

TRAYHURN, P.; ALOMAR, S. Y. Oxygen deprivation and the cellular response to hypoxia in adipocytes - perspectives on white and brown adipose tissues in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 6, p. 19, 2015. ISSN 1664-2392.

TUDOR-LOCKE, C. et al. Improving wear time compliance with a 24-hour waist-worn accelerometer protocol in the International Study of Childhood Obesity, Lifestyle and the Environment (ISCOLE). *Int J Behav Nutr Phys Act*, v. 12, p. 11, 2015. ISSN 1479-5868.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, v. 2, n. 4, p. 236-40, Oct 2011. ISSN 0976-2094.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, v. 360, n. 15, p. 1500-8, Apr 2009. ISSN 1533-4406.

VILLARROYA, F.; IGLESIAS, R.; GIRALT, M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res*, v. 2007, p. 74364, 2007. ISSN 1687-4757.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, v. 360, n. 15, p. 1518-25, Apr 2009. ISSN 1533-4406.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 11, p. 1389-94, Nov 2002. ISSN 0100-879X.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, v. 21, n. 6, p. 697-738, Dec 2000. ISSN 0163-769X.

WANG, H. et al. Insulin Signaling and Glucose Uptake in the Soleus Muscle of 30-Month-Old Rats After Calorie Restriction With or Without Acute Exercise. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 71, n. 3, p. 323-32, Mar 2016. ISSN 1758-535X.

WANG, J. et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J*, v. 9, n. 1, p. 1-15, Jan 2015. ISSN 1751-7370.

WANG, Q. et al. Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts. *J Pharm Sci*, v. 94, n. 2, p. 363-72, Feb 2005. ISSN 0022-3549

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. DETECTING THE THRESHOLD OF ANAEROBIC METABOLISM IN CARDIAC PATIENTS DURING EXERCISE. *Am J Cardiol*, v. 14, p. 844-52, Dec 1964. ISSN 0002-9149.

WESTHOFF, G.; RAU, R.; ZINK, A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. *Arthritis Rheum*, v. 56, n. 11, p. 3575-82, Nov 2007. ISSN 0004-3591.

WHITEHEAD, J. P. et al. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, v. 8, n. 3, p. 264-80, May 2006. ISSN 1462-8902

WILLIAMS, J. R.; HARRISON, T. R.; GROLLMAN, A. A SIMPLE METHOD FOR DETERMINING THE SYSTOLIC BLOOD PRESSURE OF THE UNANESTHETIZED RAT. *J Clin Invest*, v. 18, n. 3, p. 373-6, May 1939. ISSN 0021-9738.

WINKLER, M. et al. The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced rat obesity. *Br J Pharmacol*, Feb 2016. ISSN 1476-5381.

WU, M. V. et al. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure. *J Biol Chem*, v. 289, n. 49, p. 34129-40, Dec 2014.

WU, X. et al. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. *Cell Mol Immunol*, v. 3, n. 2, p. 131-7, Apr 2006. ISSN 1672-7681

XIAO, J. et al. Association of physical activity with risk of metabolic syndrome: findings from a cross-sectional study conducted in rural area, Nantong, China. *J Sports Sci*, p. 1-10, Feb 2016. ISSN 1466-447X.

XU, X. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 300, n. 5, p. R1115-25, May 2011. ISSN 1522-1490.

YAKSH, T. L. et al. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci*, v. 21, n. 16, p. 5847-53, Aug 15 2001. ISSN 1529-2401

ZHOU, M. S. et al. Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NFκB. *Cardiovasc Diabetol*, v. 14, p. 45, 2015. ISSN 1475-2840.