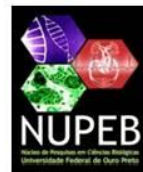




UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Associação entre Dieta Hiperglicídica e Exercício Físico Modifica o Metabolismo e a Expressão Gênica no Tecido Adiposo

Autora: Karina Barbosa de Queiroz

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Guerra de Sá

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.

Ouro Preto – MG
Agosto 2010

Q384a

Queiroz, Karina Barbosa de.

Associação entre dieta hipercálica e exercício físico modifica o metabolismo e a expressão gênica no tecido adiposo [manuscrito] / Karina Barbosa de Queiroz. - 2010.

xxv, 132 f.: il., color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia molecular.

1. Nutrição - Teses. 2. Tecido adiposo - Teses. 3. Exercícios físicos - Teses.
4. Obesidade - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 641.561:796

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular ICEB/ NUPEB/ UFOP e no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo ICB/ UFMG, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta dissertação à minha mãe, Regina, fonte de inspiração, carinho e incentivo, e ao meu irmão Luiz, pela amizade e companheirismo. Ter vocês é uma dádiva e, apesar das brigas, não seria metade do que sou sem a minha FAMÍLIA.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
e, de repente, você estará fazendo o impossível."
(São Francisco de Assis)

"A melhor maneira de aprender a desculpar os erros alheios é
reconhecer que também somos humanos, capazes de errar
talvez ainda mais desastrosamente que os outros".
(Desconhecido)

Agradecimentos

A Deus, por me dar forças para aceitar os Seus desígnios e resignação para compreendê-los da melhor forma.

À minha querida e essencial mãe Regina, por abrir mão de tantas coisas por minha felicidade. Essa conquista é mais sua do que minha. Obrigada!

Ao meu “irmãozinho” Luiz Fernando, que, apesar de suas maluquices, possui um grande coração que me ajuda a enxergar a vida de uma forma mais leve.

À Prof^a. Dra^a Renata Guerra de Sá, pela confiança depositada em meu trabalho e por acreditar, mais do que eu, na minha capacidade de realizá-lo, além de todo o carinho e “conversas amenas” que contribuíram para o meu equilíbrio e atenuação da minha ansiedade.

Ao Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista, por cuidar de mim como um pai e me auxiliar nos experimentos, bem como nos outros aspectos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Renato Migliorini, por inspirar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Elio Hideo Babá, pela convivência tão agradável e pela disponibilidade em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, por gentilmente ceder seu laboratório para a realização de alguns experimentos e pelas horas dispensadas ao diálogo e ensinamentos.

À minha querida amiga Denise, que, mesmo longe, está presente em todos os momentos da minha vida. Amo você, amiga!

Às inesquecíveis e inseparáveis amigas de graduação (e do coração) Isabel, Larissa e Priscila, por alimentarem nossa amizade e pelo carinho dedicado ao nosso relacionamento. Amo demais!

Às amigas Nathy e Robs D'Ângelo, pelas risadas, companheirismo e apoio.

À querida Robs, por se disponibilizar em me auxiliar sempre e ser uma amiga e tanto.

À Mônica Cordeiro, pelo sentimento sincero e por me ajudar sempre que pode. Não tenho como agradecer o que você faz por mim!

À Nilza, por todo apoio e carinho.

Aos amigos Matheus e Roenick, pelo companheirismo e auxílio nos experimentos.

Ao querido Listerine (Júnior), pelas conversas e risadas, além de todo o carinho e amizade.

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP, que participou da minha formação científica: Diego, Gustavo (Lula), Nayara, Eduardo, Eneida, Ezequiel, Daniel, Leandro (Dylon), Leandro (Nerso) e Víctor.

À Gisele, pela disponibilidade e solicitude em auxiliar na minha formação. Foi de bastante valia suas observações e a maneira pela qual me ensinou a organizar e realizar meus experimentos.

Ao Daniel e à Juliana, pela ajuda nos treinamentos, sacrifício e dissecação dos animais.

À Janine, pela disponibilidade em realizar alguns ensaios, pelas risadas e convívio agradável.

A toda equipe do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, pelo apoio na realização dos experimentos, em especial Patrícia e Kinulpe (meu irmão do coração), pelas gargalhadas e companhias agradáveis

Ao Prof. Dr. Mauro Isoldi e sua esposa, Aleçandra, por direcionarem o meu caminho.

Ao Thyago, por aparecer quando eu menos acreditava ser possível ser feliz ao lado de alguém.

Aos colegas do mestrado.

A todos os laboratórios do NUPEB que permitiram o uso dos equipamentos para a realização de alguns experimentos

À Cida, pelo carinho e por auxiliar em todas as questões burocráticas. Você é demais!

Às minhas queridas tias Dilma, Paula, Sílvia e Vera pela confiança e incentivo.

À querida Marlene e ao Régis, por me acolherem e apoiarem sempre! Obrigada!

Ao CNPq, FAPEMIG, CAPES e UFOP, pelo financiamento e apoio oferecido.

Aos animais experimentais, pelo sacrifício.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho. Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
I INTRODUÇÃO	1
I.1 Considerações gerais	2
I.2 Tecido adiposo (TA)	3
I.2.1 Distribuição corporal do TA	6
I.2.2 Leptina	7
I.3 Adipogênese.....	11
I.4 Inervação simpática para o TAB e TAM.....	17
I.5 Indução da obesidade pela dieta hiperglicídica.....	19
II OBJETIVOS	22
III METODOLOGIA.....	24
III.1 Estabelecimento do modelo experimental	25
III.1.1 Animais e dieta hiperglicídica (palatável).....	25
III.1.2 Protocolo de treinamento físico em esteira.....	26
III.2 Efeito da dieta sobre a distribuição dos depósitos adiposos	28
III.3 Efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre parâmetros bioquímicos	29
III.3.1 Efeito da dieta sobre os níveis plasmáticos de insulina, leptina e ácidos graxos não-esterificados (NEFAs).....	29
III.4 Análise da expressão gênica por qRT-PCR (Real time).....	30
III.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	30
III.4.2 Extração de RNA total	31

III.4.3 RT-PCR e obtenção dos cDNAs	32
III.4.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	33
III.4.4.1 Curva de eficiência dos <i>primers</i>	34
III.4.4.2 Curva de dissociação dos <i>amplicons</i>	36
III.4.4.3 Experimento de validação do $\Delta\Delta C_q$	37
III.5 Análise estatística.....	38
IV RESULTADOS.....	39
IV.1 Efeito da dieta e do exercício físico sobre os parâmetros avaliados	40
IV.1.1 Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o ganho de peso e consumo alimentar.....	40
IV.1.1.1 Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre os depósitos adiposos retroperitoneal e inguinal.....	44
IV.1.1.2 Efeito da dieta e do treinamento físico sobre o TAM	48
IV.1.1.3 Avaliação do grau de obesidade: índices de Lee e de adiposidade	49
IV.1.1.4 Comparação do desempenho físico dos animais	54
IV.1.2 Efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre os níveis plasmáticos de leptina, insulina e ácidos graxos não esterificados (NEFAs)	57
IV.1.2.1 Níveis plasmáticos de leptina.....	57
IV.1.2.2 Níveis plasmáticos de insulina	58
IV.1.2.3 Níveis plasmáticos de NEFAs	61
IV.2 Expressão gênica relativa dos transcritos avaliados.....	63
IV.2.1 Quantificação dos níveis de mRNA de <i>Ucp1</i> no TAM	63
IV.2.2 Quantificação dos níveis de mRNA de <i>Adra2</i> e <i>Adrb3</i> no TAM.....	68
IV.2.3 Quantificação dos níveis de mRNA de <i>Leptina</i> e seu receptor no TA retroperitoneal.....	69
IV.2.4 Quantificação dos níveis de mRNA do <i>rlns</i> no TA retroperitoneal.....	72
IV.2.5 Quantificação dos níveis de mRNA de <i>Ucp2</i> no TA retroperitoneal.....	75
IV.2.6 Quantificação dos níveis de mRNA de <i>Adra2</i> e <i>Adrb3</i> no TA retroperitoneal	79
V DISCUSSÃO	81

VI CONCLUSÃO	95
VII PERSPECTIVAS.....	98
VIII REFERÊNCIAS.....	100
IX ANEXOS	118

RESUMO

O fenótipo de obesidade tem sido atribuído a questões multifatoriais. Uma dieta mal balanceada, associada ao sedentarismo, tem contribuído para a alta incidência da patologia, além de provocar alterações nos parâmetros plasmáticos do metabolismo de carboidratos e lipídeos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da dieta hiperglicídica em associação ao treinamento físico em esteira sobre a distribuição dos tecidos adiposos (TA) retroperitoneal, inguinal e marrom (TAM) e os níveis plasmáticos de leptina, insulina e NEFAs, bem como a capacidade de realização de trabalho dos animais treinados em esteira e a expressão relativa de *Ucp1*, *Adra2* e *Adrb3* no TAM e *receptor de insulina*, *leptina* e seu receptor, *Ucp2*, *Adra2* e *Adrb3* no TA retroperitoneal. Ratos Wistar recém-desmamados (28 dias) foram distribuídos em grupos: dieta controle balanceada sedentário (CS); dieta controle balanceada treinado em esteira (CTE); dieta hiperglicídica sedentário (DS) e dieta hiperglicídica treinado em esteira (DTE). O treinamento físico em esteira teve aumentos graduais na intensidade do exercício, cinco vezes por semana, com duração de quatro ou oito semanas. Após este período, os animais foram decapitados, os TA pesados e os níveis plasmáticos de leptina, insulina e NEFAs determinados. Posteriormente, os níveis de mRNA dos genes descritos acima foram verificados pela metodologia de qRT-PCR, com o método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. O gene *rRNA18S* foi escolhido como normalizador. Os resultados obtidos mostram que o treinamento em esteira não reverte o aumento de peso dos TA induzidos pela dieta. Entretanto, para os animais que receberam dieta controle balanceada, houve redução na adiposidade após quatro semanas. Os níveis plasmáticos de leptina aumentaram nos grupos DS, e a hiperleptinemia foi reduzida pelo treinamento em esteira apenas durante quatro semanas. Os níveis de insulina não foram alterados, havendo uma redução do hormônio apenas para o grupo DTE por quatro semanas. Os níveis de NEFAs não apresentaram diferenças e a melhora na capacidade de realização de trabalho nos animais foi observada a partir de quatro semanas de treinamento em esteira. A expressão gênica relativa apresentou um padrão diferencial quando comparamos os dois períodos de

treinamento. Ocorreu um aumento na expressão de *Leptina* no TA retroperitoneal dos grupos DS que foi bloqueado pela associação da dieta com o treinamento. Um efeito similar foi observado na expressão da *Ucp2* no TA retroperitoneal. Também foi observado um aumento na transcrição de *Ucp1* e *Adrb3* no TAM. A análise dos dados apresentados sugere que um período de 5 semanas de dieta é suficiente para o estabelecimento de um modelo de obesidade e que a capacidade de realização de trabalho é aumentada pelo treinamento físico em esteira a partir de 4 semanas. Além do mais, o treinamento físico provoca alterações no perfil metabólico que não são mantidas após 8 semanas, havendo uma adaptação dos animais ao desafio proposto e o estabelecimento de alterações metabólicas mais atenuadas no tecido adiposo.

ABSTRACT

The phenotype of obesity has been attributed to multifactorial issues. A poorly balanced diet, associated with a sedentary lifestyle has contributed to the high incidence of the disease, in addition, causing changes in plasma parameters of the metabolism of carbohydrates and lipids. The aim of this study was to evaluate the influence of high carbohydrate diet in association with physical training on a treadmill exercise on the maintenance of retroperitoneal, inguinal and brown (BAT) adipose tissue (AT) and plasma levels of leptin, insulin and NEFAs, as well as the trained animals ability to perform the work on a treadmill exercise and the relative expression of *Ucp1*, *Adra2* and *Adrb3* in BAT and insulin receptor (*Insr*), leptin and its receptor, *Ucp2*, *Adra2* and *Adrb3* in retroperitoneal AT. Weaned Wistar rats (28 days) were distributed in the following groups: sedentary balanced control diet (SC), trained on a treadmill exercise balanced control diet (TTC); sedentary high carbohydrate diet (SD) and trained on a treadmill exercise high carbohydrate diet (TTD). The physical training on the treadmill exercise had progressive increases in exercise intensity, five times a week, lasting four or eight weeks. After this period, the animals were decapitated, AT was weighed and the plasma levels of leptin, insulin and NEFAs were determined. Subsequently, the mRNA levels of genes described above were determined by qRT-PCR methodology with the method of $2^{-\Delta\Delta Cq}$. The gene rRNA18S was chosen as normalizer. The treadmill exercise training did not reversed the weight gain of AT induced by diet. However, for the animals that received balanced control diet, there was a reduction in adiposity after four weeks. Plasma levels of leptin increased in the SD groups, and hyperleptinemia was reduced by training on a treadmill exercise only for four weeks. Insulin levels were not altered, with reduction of hormone for the TTD group subjected to exercise on a treadmill for four weeks. NEFAs levels showed no differences and the improvement in ability to perform the work in animals were observed from four weeks of training on a treadmill exercise. The gene expression showed a different standard when comparing the two periods of training. There was an increased expression of *Leptin* in the retroperitoneal AT of the SD group, which was blocked by the combination of diet and training on a treadmill exercise. A similar effect was observed in the expression

of *Ucp2* in the retroperitoneal AT. There was an increase in the expression of *Ucp1* and *Adrb3* in BAT. The data analysis presented above suggests that the proposed model leads to obesity from five weeks of diet and the ability to perform work is increased by training on a treadmill exercise from four weeks. Moreover, the metabolic changes influenced by exercise that are not maintained after eight weeks of training on a treadmill exercise, suggesting an adaptation of the animals to the proposed challenge and the establishment of weaker metabolic changes in adipose tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adra2: do inglês, *Adrenergic alpha-2A receptor*
Adrb3: do inglês, *Adrenergic beta-3 receptor*
ADD: do inglês, *Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor*
AgRP: do inglês, *Agouti-Related Peptide*
aP2: do inglês, *Adipocyte protein 2*
Baseline: ciclos iniciais em que há pequenas alterações na fluorescência
cAMP: adenosina monofosfato cíclico
CART: do inglês, *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript*
CI/EBP: do inglês, *CCAT/Enhancer Binding Protein*
Cidea: do inglês, *Cell death-inducing DFFA-like effector a*
CHOP: do inglês, *C/EBP homologous protein*
Cox8b: do inglês, *Cytochrome c oxidase, subunit VIIIb*
CNA: comprimento naso-anal
CREB: do inglês, *cAMP Response Element Binding Protein*
CS: dieta controle balanceada sedentário
GM-CSF: do inglês, *Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor*
CTE: dieta controle balanceada treinado em esteira
Cq: do inglês, *quantification cycle*
Dio2: do inglês, *Deiodinase type 2*
DGK: do inglês, *Diacylglycerol Kinase*
Dlk: do inglês, *Delta like homolog (Drosophila)*
dNTP: Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DS: dieta hiperglicídica sedentário
DTE: dieta hiperglicídica treinado em esteira
Elovl3: do inglês, *Elongation of very long chain fatty acids-like 3*
ERK: do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase*
Fabp4: do inglês, *Fatty acid bind protein 4*
G3P: glicerol-3-fosfato
GLUT4: do inglês, *Glucose Transporter type 4*
GRE: do inglês, *Glicocorticoid Response Elements*
GRH: do inglês, *Growth Hormone*
HIF-1 α : do inglês, *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*

IA: Índice de **Adiposidade**
IBGE: Instituto **B**rasileiro de **G**eografia e **E**statística
IRS: do inglês, ***Insulin Receptor Signaling***
JAK: do inglês, ***Janus Kinase***
JNK: do inglês, ***Jun N-terminal Kinase***
MG: peso absoluto da **massa gorda**
MM: peso absoluto da **massa magra**
mRNA: RNA mensageiro
MSH: do inglês, ***Melanocyte-Stimulating Hormone***
NE: Norepinefrina
NEFAs: do inglês, ***Non Esterified Fatty Acids***
NO: do inglês, ***Nitric Oxide***
NPY: do inglês, ***Neuropeptide Y***
OMS: Organização Mundial da Saúde
p38: p38 quinase
p70S6K: do inglês, ***70kDa Ribosomal S6 Kinase***
pb: pares de **bases**
PC: peso corporal
PDE3B: do inglês, ***Phosphodiesterase type 3B***
PEPCK: do inglês, ***Phosphoenolpyruvate carboxykinase***
PGC1: do inglês, ***Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1***
PGE2/ F2: do inglês, ***Prostaglandin E2 and F2***
PI3K: do inglês, ***Phosphatidylinositol 3-kinase***
PKA: do inglês, ***cAMP-dependent Protein Kinase***
PLC: do inglês, ***Phospholipase C***
POMC: do inglês, ***Pro-opiomelanocortin***
PPAR: do inglês, ***Peroxisome Proliferator-Activated Receptor***
PRDM16: do inglês, ***PRD1-BF-1-RIZ1 Homologous Domain-Containing Protein-16***
Pref-1: do inglês, ***Preadipocyte factor 1***
qRT-PCR: do inglês, ***Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction***
Rac: do inglês, ***Rho-associated coiled-coiled- containing kinase***
RhoA: do inglês, ***Rhodopsin A***
RIA: do inglês, ***RadiolImmunoAssay***
rlns: receptor de **Insulina**

RGD: do inglês, *Rat Genome Database*

rLep: receptor de Leptina

Rn: repórter normalizado

ROS: do inglês, *Reactive Oxygen Species*

ROX: referência passiva

rRNA18S: do inglês, *ribossomal RNA 18S*

RT: do inglês, *Reverse Transcriptase*

RXR: do inglês, *Retinoid X Receptor*

SHP-2: do inglês, *Shatterproof 2*

SOCS-3: do inglês, *Suppressor of Cytokines Signaling-3*

SNS: sistema nervoso simpático

SREBP: do inglês, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

STAT: do inglês, *Signal Transduction and Activation of Transcription*

t: tempo até a fadiga

TA: tecido adiposo

TAB: tecido adiposo branco

TAG: triacilglicerol

TAM: tecido adiposo marrom

TBE: Tris-Borato-EDTA

θ: inclinação da esteira

Threshold: desvio padrão médio do repórter normalizado (Rn) para os ciclos iniciais da PCR multiplicado por um fator ajustável.

Tm: Temperatura de *melting*

Ucp1: do inglês, *Uncoupling protein 1*

Ucp2: do inglês, *Uncoupling protein 2*

V: velocidade da esteira

VEGF: do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*

W: trabalho

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mecanismo de ativação da via JAK/ STAT pela leptina (L).	9
Figura 02: Vias de sinalização reguladas pela leptina.	10
Figura 03: Diferenciação da célula mesenquimal tronco.	14
Figura 04: Semana de adaptação dos animais recém-desmamados.	27
Figura 05: Análise da qualidade do RNA total de animais submetidos a 4 semanas de treinamento físico em esteira em gel de agarose/formamida a 1,2%.	32
Figura 06: Gráfico de amplificação referente à curva de eficiência do gene Ucp1 utilizando diluição seriada de 4x de cDNA do TAM.	34
Figura 07: Curva padrão referente ao gene Ucp1 utilizando diluição seriada de 4x de cDNA do TAM.	35
Figura 08: Curva de dissociação referente ao amplicon do primer Ucp1.	37
Figura 09: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre o peso final (A) e o ganho de peso (B) dos animais após 4 e 8 semanas.	42
Figura 10: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre a ingestão alimentar (A) e calórica (B) dos animais após 4 e 8 semanas.	44
Figura 11: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre os depósitos retroperitoneal (A) e inguinal (B).	47
Figura 12: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o TAM.	49

Figura 13: Grau de obesidade determinado pelos índices de Lee (A) e de adiposidade (B) dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	51
Figura 14: Relação entre ganho de peso e índice de adiposidade (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas.....	53
Figura 15: Relação entre ganho de peso (g) e índice de adiposidade (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.....	54
Figura 16: Capacidade de realização de trabalho dos animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas.....	56
Figura 17: Níveis plasmáticos de leptina (ng/mL) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	58
Figura 18: Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	60
Figura 19: Níveis plasmáticos de NEFAs (mmol/L) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	62
Figura 20: Relação entre níveis plasmáticos de leptina (ng/ mL) e NEFAs (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.....	63
Figura 21: Expressão relativa do gene <i>Ucp1</i> no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.....	64
Figura 22: Relação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de <i>Ucp1</i> (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas.....	65

Figura 23: Relação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de <i>Ucp1</i> (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.	67
Figura 24: Expressão relativa do gene <i>Adra2a</i> no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	68
Figura 25: Expressão relativa do gene <i>Adrb3</i> no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	69
Figura 26: Expressão relativa do gene <i>Leptina</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	70
Figura 27: Expressão relativa do gene <i>rLep</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	71
Figura 28: Relação entre número de moléculas de mRNA de <i>Leptina</i> e níveis de leptina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.	72
Figura 29: Expressão relativa do gene <i>rIns</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	73
Figura 30: Relação entre número de moléculas de mRNA de <i>rIns</i> e níveis de insulina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas.	74
Figura 31: Relação entre número de moléculas de mRNA de <i>rIns</i> e níveis de insulina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.	75
Figura 32: Expressão relativa do gene <i>Ucp2</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	76

Figura 33: Relação entre índice de adiposidade e número de moléculas de mRNA de <i>Ucp2</i> (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas.	77
Figura 34: Relação entre índice de adiposidade e número de moléculas de mRNA de <i>Ucp2</i> (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas.	78
Figura 35: Expressão relativa do gene <i>Adra2a</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	79
Figura 36: Expressão relativa do gene <i>Adrb3</i> no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Constituição e composição nutricional das rações.	25
Tabela 02: Protocolo de treinamento na semana de adaptação e teste progressivo.	26
Tabela 03: Protocolo de treinamento físico em esteira dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento.	28
Tabela 04: Número de acesso ao RGD das sequências de <i>primers forward</i> (F') e <i>reverse</i> (R') referentes aos genes avaliados, temperatura de melting (T _m) e tamanho do <i>amplicon</i> gerado.	31
Tabela 05: Sequências de <i>primers forward</i> (F') e <i>reverse</i> (R'), <i>slope</i> , eficiência de reação e coeficiente de correlação (R ²) referentes aos genes avaliados.	36
Tabela 06: Valores de <i>slope</i> dos genes avaliados para validar o uso do método do $\Delta\Delta C_q$	38
Tabela 07: Ganho de peso dos grupos submetidos a 4 semanas de treinamento em esteira.	40
Tabela 08: Ganho de peso dos grupos submetidos a 8 semanas de treinamento em esteira.	41
Tabela 09: Consumo alimentar (g) e ingestão calórica (kcal) dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	43
Tabela 10: TA retroperitoneal e inguinal dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	45
Tabela 11: TAM de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	48

Tabela 12: Índices de Lee e de adiposidade dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	50
Tabela 13: Correlação entre ganho de peso e índice de adiposidade dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	52
Tabela 14: Capacidade de realização de trabalho de animais submetidos 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	55
Tabela 15: Níveis plasmáticos de leptina (ng/mL) de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	57
Tabela 16: Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	59
Tabela 17: Correlação entre níveis plasmáticos de insulina e leptina dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	60
Tabela 18: Níveis plasmáticos de NEFAs de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	61
Tabela 19: Correlação entre níveis plasmáticos de leptina e NEFAs dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	62
Tabela 20: Correlação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de <i>Ucp1</i> dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.....	65
Tabela 21: Correlação entre o número de moléculas de mRNA de <i>Leptina</i> e leptina plasmática de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	71
Tabela 22: Correlação entre o número de moléculas de mRNA de <i>rlns</i> e insulina plasmática de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	73

Tabela 23: Correlação entre índice de adiposidade e o número de moléculas de mRNA de <i>Ucp2</i> de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.	76
--	----

I INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O balanço energético corporal é mantido através de alterações na ingestão de calorias e no gasto energético. Prolongado balanço energético positivo, em que a ingestão excede o gasto, promove obesidade, uma patologia caracterizada pelo ganho de peso excessivo resultante do acúmulo do tecido adiposo branco (TAB), considerada o problema de saúde pública mais comum do século XXI dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (PALOU, 2001; BOWERS e cols., 2004). De acordo com dados da organização mundial de saúde, cerca de 1,5 milhões de indivíduos se tornarão obesos até o ano de 2015, e, apenas nos Estados Unidos, 400 mil cidadãos chegarão ao óbito em razão das doenças coronárias em 2010 (OMS, 2010). Isso é devido ao fato de a obesidade induzir modificações no metabolismo dos carboidratos e lipídeos e estimular o surgimento de resistência à insulina e de disfunção autonômica, representando o principal fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, fígado gorduroso, doença de Alzheimer, cálculo biliar e alguns tipos de câncer (KAUFMAN e cols., 1991; GREGOIRE e cols., 1998; GREGOIRE, 2001; BESKE e cols., 2002; BOWERS e cols., 2004; FANTUZZI, 2005; LAPLANTE e cols., 2006; GESTA e cols., 2007).

O desenvolvimento da obesidade tem sido atribuído a questões multifatoriais, como resultado de mudanças genéticas ou adquiridas nos três principais tipos de processos bioquímicos envolvidos no seu surgimento (PALOU, 2000; BESKE e cols., 2002): controle da ingestão (WOODS e cols., 1998; SCHWARTZ e cols., 2000), eficiência energética (LOWELL e cols., 2000) e adipogênese (WU e cols., 1999; MORRISON e cols., 1999).

A facilidade nos dias de hoje em se obter alimentos, associada à dieta mal balanceada e ao sedentarismo, muito tem contribuído para a alta incidência da obesidade, não apenas em indivíduos adultos, mas em crianças e adolescentes (PALOU, 2000; IBGE, 2004). Entretanto, o aumento da prevalência da obesidade pode ser parte de um processo evolutivo, uma vez que os organismos desenvolveram mecanismos eficientes para estoques energéticos que vão de encontro às mudanças nos hábitos de vida do homem moderno (GROOP, 1999;

KREIER e cols., 2003, SEALE e cols., 2009). Estas mudanças de hábitos compreendem a inatividade física e a ingestão calórica em excesso, que levam ao ganho de peso elevado, hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, resultando em alterações nos parâmetros lipídicos do plasma (KREIER e cols., 2003) e modificações no balanço autonômico (BUNAG e cols. 1990; KAUFMAN e cols., 1991; BUNAG e cols., 1996, DE LIMA e cols., 2008).

Contudo, o desenvolvimento da obesidade e suas consequências não dependem somente do balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético, mas também do equilíbrio entre os dois tipos celulares que compõem o tecido adiposo, os adipócitos brancos e marrons, e da distribuição da gordura corporal, uma vez que existem sítios de deposição mais correlacionados com as complicações metabólicas do que outros (GESTA e cols., 2007).

1.2 Tecido adiposo (TA)

Os lipídeos são a forma primária de estoque de energia nos mamíferos. Por serem hidrofóbicos, podem ser armazenados em grandes quantidades no tecido adiposo branco (TAB), dispensando a participação da água como solvente e, quando oxidados, fornecem mais que o dobro de energia metabólica em comparação ao glicogênio e às proteínas (AHIMA e col., 2000a).

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TAG, mobilizando-os pela lipólise numa situação de *déficit* calórico (AHIMA e col., 2000a).

Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (AHIMA e col., 2000a).

O desenvolvimento do TAB no período pós-natal ocorre em resposta ao balanço energético positivo e, até a década de 1990, o TAB era considerado um passivo depósito de energia, estocando ou liberando lipídeos sob a influência de

hormônios. Entretanto, FRIEDMAN e cols. (1994) clonaram o gene da obesidade (gene *ob*) e caracterizaram funcionalmente o seu produto, a leptina, tornando-se evidente que o TA é um órgão chave na regulação da homeostase do balanço energético corporal, sendo considerado um órgão endócrino dinâmico com funções pleiotrópicas (GREGOIRE, 2001; VAN HARMELEN e cols., 2002; CINTI, 2005; CARTWRIGHT e cols., 2007; GESTA e cols., 2007; PROKESH e cols., 2009).

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O adipócito branco maduro armazena TAG em uma única e grande gota lipídica, que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo a uma fina camada de citosol para a periferia da célula. É interessante ressaltar que, durante seu desenvolvimento, a célula jovem contém múltiplas gotículas de lipídios, que coalescem para formar uma inclusão lipídica unitária com o amadurecimento celular. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que hemácias, fibroblastos e células do sistema imune, e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada (POND, 2001).

O tecido adiposo marrom (TAM) exerce um papel central na termogênese e na regulação do gasto energético, e sua função primordial é oxidar lipídeos e dissipar a energia produzida como calor, participando ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM são encontrados nos pequenos mamíferos e em fetos e recém-nascidos humanos, estando praticamente ausentes nos adultos por serem substituídos, em sua maioria, pelo TAB. O adipócito marrom pode atingir 60 µm de diâmetro, sendo, geralmente, muito menor que o adipócito branco, que tem um tamanho médio de 90-100 µm. Neste tipo celular, os lipídeos são estocados em múltiplas gotículas citoplasmáticas, o citoplasma é relativamente abundante e o núcleo é esférico e ligeiramente excêntrico. A sua característica é o grande número de mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor. Este processo ocorre devido à presença de proteínas desacopladoras (UCPs), principalmente a UCP1, que estão localizadas na membrana mitocondrial interna do adipócito marrom e

direcionam o mecanismo de dissipação do gradiente de prótons durante o ciclo de Krebs, desviando estes prótons do complexo F1F0 (*ATP sintase*) e impedindo a síntese de ATP, permitindo que se dissipe em calor a energia estocada na mitocôndria (SUSULIC e col., 1995; PALOU e cols., 1998; KLINGENBERG, 1999; KIM e cols., 2000a; LOWELL e col., 2000; MORRISON e cols., 2000; PALOU, 2000; GREGOIRE, 2001; CURI e cols., 2002; BOWERS, 2004; CANNON e col., 2004; PROKESH, 2009; SEALE e cols., 2009; WOLF, 2009). A contribuição na termogênese dos dois homólogos mitocondriais da UCP, UCP2 e UCP3, expressos em outros tecidos, como TAB e músculo esquelético, permanece incerta (SEALE e cols., 2009).

A alta concentração de citocromo oxidase dessas mitocôndrias contribui para a coloração mais escurecida das células e do tecido (CANNON e col., 2004).

O TAB, ao contrário do TAM, apresenta funções mais abrangentes. Por constituir depósitos localizados em diversas regiões do organismo envolvendo, ou mesmo se infiltrando em órgãos e estruturas internas, o TAB oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permite um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo, e por ser um excelente isolante térmico, tem papel importante na manutenção da temperatura corporal. Outra função, mencionada anteriormente, refere-se a sua capacidade de armazenar energia com necessidade de pouca água, fornecendo mais calorias por grama em comparação ao carboidrato (9 kcal.g^{-1} vs. 4 kcal.g^{-1}), o que dá ao TAB o *status* de importante sistema tamponante para o balanço energético (CARTWRIGHT e cols., 2007).

Além disso, os adipócitos brancos exercem um papel central na regulação do balanço energético, secretando adipocinas e lipocinas que interagem com outros tecidos para equilibrar a resposta metabólica por todo o corpo, influenciando na sensibilidade a insulina, resposta imunológica e doenças vasculares (KIM e cols., 2000a; MORRISON e cols., 2000; GREGOIRE, 2001; BOWERS, 2004; PROKESH, 2009; WOLF, 2009).

1.2.1 Distribuição corporal do TA

Muitos estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado um papel essencial na distribuição anatômica do tecido adiposo, mostrando que variações regionais no acúmulo da massa de gordura são mais preditivas de anormalidades metabólicas que o aumento da massa de gordura *per si* (CAREY e cols., 1998; BJÖRNTORP e cols., 1999; BERGMAN e cols., 2001; MISRA e cols., 2003; TCHOUKALOVA e cols., 2004; VAN HARMELEN e cols., 2006).

Dessa forma, a obesidade com deposição de gordura intra-abdominal/visceral (obesidade central ou em forma de “maçã”) está correlacionada ao aumento da susceptibilidade a distúrbios metabólicos, como intolerância a glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão, em relação aos indivíduos com quantidades similares de tecido adiposo estocado nos depósitos subcutâneos (obesidade periférica ou em forma de pêra) (BJÖRNTORP e cols., 1989; KISSEBAH e cols., 1994; WAJCHENBERG, 2000; GESTA e cols., 2007). Uma expansão do TAB visceral pode estar associada à elevação dos níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) na circulação, que contribui com a resistência a insulina no fígado e músculo esquelético, bem como prejudica a secreção de insulina pelo pâncreas (KISSEBAH e cols., 1994; ARNER, 1995; CARTWRIGHT e cols., 2007; GESTA e cols., 2007).

Estes achados evidenciam diferenças na função endócrina entre as regiões adiposas (ARNER, 2001). Por exemplo, comparado ao subcutâneo, os adipócitos viscerais são relativamente resistentes à ação antilipolítica da insulina, mas mais sensíveis à estimulação da lipólise pelas catecolaminas, o que aumenta os níveis de NEFAs circulantes e desencadeia os sintomas da síndrome plurimetabólica (ARNER, 1995, VAN HARMELEN e cols., 2004). Entretanto, não é claro como alguns indivíduos ganham gordura visceral em detrimento da subcutânea (TCHOUKALOVA e cols., 2004). Compreender estes mecanismos pode fornecer o elo entre obesidade central e resistência a insulina.

Embora diversos estudos tenham focado em diferenças no metabolismo e função endócrina do TA, pouca informação está disponível sobre diferenças regionais no desenvolvimento dos adipócitos (PETTERSON e cols., 1985; HAUNER

e cols., 1988; HAUNER e cols., 1991; AILHAUDE e cols., 1998; SHAHPARAKI e cols., 2002). Este tipo de informação é importante para compreender como a distribuição de gordura é regulada e desenvolver novas estratégias para interferir no desenvolvimento do TAB (VAN HARMELEN e cols., 2004).

I. 2.2 Leptina

Vários grupos independentes demonstraram nos últimos 20 anos que o TAB tem a propriedade de secretar uma grande variedade de proteínas, coletivamente denominadas *adipocinas*, consolidando a idéia de que este tecido não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas sim, um órgão endócrino dinâmico envolvido em uma variedade de processos metabólicos e fisiológicos. A estrutura protéica, assim como a função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento é altamente variada e compreende proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), fatores de crescimento (fator transformador de crescimento β , TGF- β) e proteínas da via alternativa do sistema complemento (adipsina). Outras adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio), homeostase vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1, PAI-1), homeostase glicêmica (adiponectina) e angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular, VEGF) (FRÜHBECK e cols., 2001a; KERSHAW e col., 2004).

A leptina é uma das adipocinas mais importantes. Desde a clonagem do gene *ob* em 1994 (ZHANG e cols., 1994) e caracterização do seu produto, a leptina, o complexo mecanismo molecular que integra a regulação da ingestão alimentar, gasto energético e reservas de gordura começou a ser compreendido.

A leptina, proteína pequena com 167 resíduos de aminoácidos e 16 kDa, é codificada por um gene que contém três éxons e dois íntrons. Além de duas sequências repetidas (MER11 e ALU), a região promotora tem sítios de ligação como *TATA Box*, e elementos responsivos a C/EBPs (proteínas ligadoras ao amplificador CCAAT), GRE (elemento responsivo a glicocorticóides) e CREB (proteína ligadora ao elemento responsivo ao AMPc) (GONG e cols., 1996). A transcrição e tradução ocorrem no tecido adiposo, placenta e trato gastrointestinal,

onde a razão de produção é diretamente relacionada à massa de tecido adiposo. Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de seu mRNA no tecido adiposo. Outros fatores metabólicos e endócrinos também contribuem para a regulação de sua transcrição. A insulina apresenta relação diretamente proporcional com os níveis de leptina (SALADIN e cols., 1995; LEROY e cols., 1996). Glicocorticóides, estrógenos, citocinas inflamatórias e quadros de infecção aguda aumentam (DE VOS e cols., 1995; MURAKAMI e cols., 1995; SLIEKER e cols., 1996), enquanto baixas temperaturas, estimulação adrenérgica, hormônio do crescimento, hormônios tireoidianos, esteróides androgênicos, melatonina e fumo parecem diminuir os seus níveis (TRAYHURN e cols., 1996; SWEENEY, 2002).

Um ano depois da descoberta da leptina, o gene *db* (ou *lepR*), que codifica o receptor de leptina, OB-R (expresso no hipotálamo e outras partes do SNC e nos tecidos periféricos) foi identificado (TARTAGLIA e cols., 1995) e caracterizado (CHEN e cols., 1996; CHUA e cols., 1996). Subsequentemente, vários neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos foram descritos no SNC, como o NPY (neuropeptídeo Y) e MSH (hormônio melanotrópico), respectivamente, cujas funções estão ligadas às da leptina (PALOU e col., 1998; PALOU, 1998; WOOD e cols., 1998; PALOU e col., 1999; SCHWARTZ e cols., 2000).

Os receptores da leptina pertencem à família de receptores das citocinas I, que inclui os receptores para as interleucinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos), GRH (hormônio do crescimento), prolactina e eritropoetina (JÉQUIER, 2002; FRÜHBECK, 2006).

Na presença de leptina, seus receptores dimerizam e são ativados por alterações conformacionais, levando à ativação de proteínas JAK (Janus quinase) e STAT (transdução do sinal e ativação da transcrição) (FRÜHBECK, 2006). Os monômeros do receptor são então fosforilados no resíduo de tirosina do domínio intracelular pela JAK2, passando a ancorar três proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição (STATs 3, 5 e 6). As STATs ancoradas são então fosforiladas em resíduos de tirosina pela JAK, dissociando-se do receptor e formando homo ou heterodímeros que se movimentam no núcleo, onde se ligam a

seqüências específicas de DNA, estimulando assim a expressão de genes-alvos específicos (Figura 01).

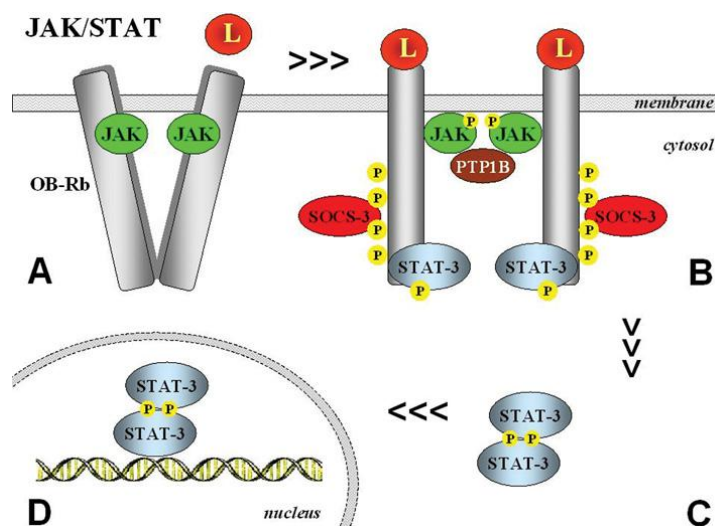


Figura 01: Mecanismo de ativação da via JAK/ STAT pela leptina (L). Após a ligação da leptina, uma mudança conformacional em seu receptor (Ob-Rb) (A) permite a justaposição e ativação de JAKs, que se tornam capazes de fosforilar resíduos de tirosina de outras JAKs e do receptor de leptina (B). A ativação da JAK2 fosforila resíduos de tirosina do domínio intracelular do receptor e permite a associação de proteínas STATs, que são fosforiladas pelas JAKs e dissociam-se dos receptores, formando dímeros (C) que se deslocam até o núcleo para regular a expressão gênica, ligando-se a regiões promotoras específicas de genes-alvos (D). Adaptado de FRÜHBECK, 2006.

A leptina também interage com outras vias de transdução do sinal, tais como JNK (NH2-terminal C - Jun quinase), p38 (p38 MAP quinase), quinase regulada extracelularmente (ERK), fosfolipase C (PLC), prostaglandinas E2/ F2 (PGE2/ F2). O papel multifuncional deste hormônio é sumarizado pela Figura 02.

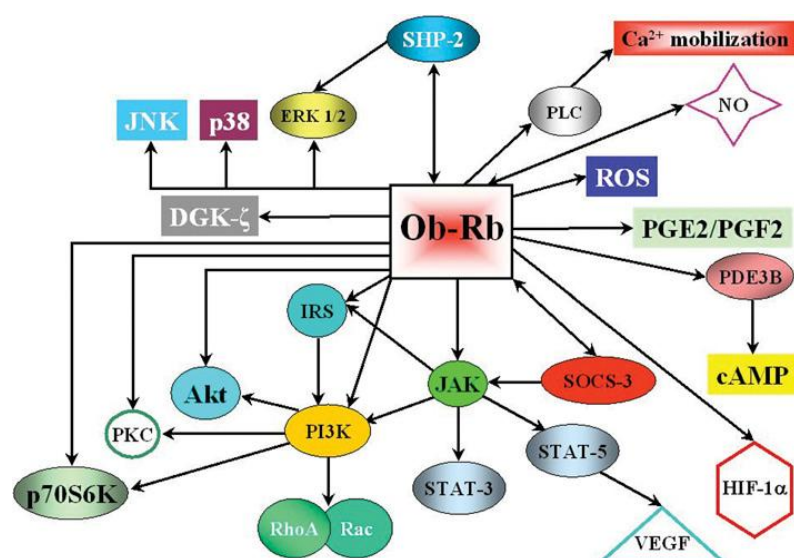


Figura 02: Vias de sinalização reguladas pela leptina. O diagrama esquemático sumariza as numerosas e diversas vias em que a leptina está envolvida. DGK, diacilglicerol quinase; PG, prostaglandina; PLC, fosfolipase C; ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de FRÜHBECK, 2006.

A leptina se liga em receptores de duas populações distintas de neurônios hipotalâmicos, controlando o comportamento alimentar e o gasto energético. Uma população sintetiza e libera dois neuropeptídeos orexígenos (que estimulam a ingestão alimentar), o neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo agouti (AgRP). Outra população expressa os neuropeptídeos anorexígenos MSH (hormônio melanotrófico), derivado dos neurônios POMC (pró-ópio melanocortina), e CART (transcrito relacionado à cocaína e anfetamina). A leptina reduz a expressão dos neuropeptídeos orexígenos e estimula os peptídeos anorexígenos, inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético total, via inervação simpática (JÉQUIER, 2002).

Seus efeitos também se estendem ao metabolismo lipídico, com a ativação da adenil-ciclase e aumento da oxidação lipídica no músculo esquelético e supressão da atividade da esterol-CoA dessaturase no fígado, reduzindo a síntese de TAG a partir de ácidos graxos monoinsaturados.

Os dados provenientes do mecanismo de ajuste da leptina reforçaram a teoria lipostática (KENEDDY, 1953), a qual postula que o tamanho dos depósitos adiposos é regulado por um produto destes depósitos que, via sistema circulatório, age no SNC para controlar a ingestão alimentar.

Devido à ação pleiotrópica da leptina, além de importante lipostato, a sinalização mediada por este hormônio regula diversas funções metabólicas, exercendo seus efeitos na reprodução, angiogênese, resposta imune, controle da pressão sangüínea e osteogênese, evidenciando seu papel de citocina multifuncional, envolvendo diversas funções celulares em todo o organismo (PALOU e cols., 2000).

1.3 Adipogênese

O armazenamento de lipídeos como estoque de energia em mamíferos é decorrente da esterificação de ácidos graxos pelo glicerol-3-fosfato (G3P) no TAB, resultando em aumento do volume das células de gordura. Quando a capacidade de armazenamento de TAG de um adipócito ultrapassa o seu limite, inicia-se a expansão do TAB, o que dispara o aumento do número de células (BOWERS e cols., 2004). Dessa forma, o desenvolvimento do TAB é resultado de dois processos: o aumento no número de adipócitos (hiperplasia), desenvolvidos a partir de uma célula precursora e o crescimento de células individuais de gordura (hipertrofia) devido à incorporação de TAGs (BOWERS e cols., 2004; PROKESH e cols., 2009). Sendo assim, a massa de gordura corporal total é determinada pelo número e tamanho dos adipócitos.

Os estudos sobre o processo de diferenciação do tecido adiposo, fenômeno denominado adipogênese, têm sido extensivamente realizados *in vitro*, com o intuito de desvendar a base molecular e celular do desenvolvimento do TA e o seu comprometimento em estados fisiológicos e patológicos, de modo a permitir a formulação de estratégias terapêuticas e preventivas para o controle do excesso de TA (obesidade) e de sua escassez (lipodistrofias e lipoatrofias) (GREGORIE e cols., 1998; GREGORIE, 2001; GESTA e cols., 2007; PROKESH e cols., 2009).

Inicialmente, foi proposto que indivíduos com início precoce da obesidade apresentavam hiperplasia e hipertrofia, enquanto indivíduos com início da obesidade na vida adulta exibiam aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) (HIRSCH e col., 1976). Entretanto, outros estudos questionam esta hipótese, uma vez que dados experimentais sugerem que a expansão do TAB durante a vida adulta não resulta somente do aumento do tamanho dos adipócitos, mas também do aumento do número destas células (PRINS e col., 1997; HALVORSEN e cols., 2001; HAUSMAN e cols., 2001; SEN e cols., 2001; WABITSCH e cols., 2001; GESTA e cols., 2007; PROKESH e cols., 2009).

A partir de estudos morfológicos realizados em embriões humanos, porcos e murinos, ficou comprovado que a adipogênese se inicia antes do nascimento. A cronologia do aparecimento do TA é estritamente dependente da espécie e do depósito adiposo sob consideração. Após o nascimento ocorre uma expansão rápida do TA, envolvendo a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos (PRINS e col., 1997; HALVORSEN e cols., 2001; HAUSMAN e cols., 2001; SEN e cols., 2001; WABITSCH e cols., 2001; BOWERS e cols., 2004; GESTA e cols., 2007; PROKESH e cols., 2009), que pode ser influenciada pelo tamanho, frequência e composição das refeições, hábitos comportamentais e estilo de vida (PALOU, 2000). Mudanças no número de adipócitos (hiperplasia) ocorrem mediante um complexo arranjo de eventos que envolvem a diferenciação de células precursoras da linhagem adipogênica e a proliferação e diferenciação dos pré-adipócitos, sendo que esta capacidade de gerar novas células de gordura continua por toda a vida (PALOU, 2000; SUZUKI e cols., 2008).

Apesar de alguns avanços a respeito do processo de diferenciação dos adipócitos, pouco se conhece sobre o padrão de expressão gênica que sustenta este processo, ressaltando a importância da adipogênese e a necessidade de compreendê-la em níveis moleculares (BOWERS e cols., 2004; GESTA e cols., 2007; PROKESH e cols., 2009).

Sabe-se que a transição do pré-adipócito até o adipócito maduro envolve 4 estágios: *growth arrest*, expansão clonal, diferenciação inicial e diferenciação terminal, entretanto, o mecanismo não está esclarecido. Sabe-se que a

diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado (GREGOIRE e cols., 1998).

Vários grupos identificaram fatores de transcrição que promovem a adipogênese, desempenhando um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante este processo. Estes fatores de transcrição adipogênicos são pertencentes a três famílias: C/EBPs (proteínas ligantes ao amplificador CCAAT), PPAR (receptor ativado por proliferadores de peroxissomas) e proteína ligadora do elemento regulado por esteróis ou fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (SREBP ou ADD) (SMAS e col., 1995; MORRISON e col., 1999; WU e cols., 1999; FARMER, 2006).

A linhagem de células adiposas deriva de um precursor embrionário multipotente que se diferencia em vários tipos de células mesodérmicas (SMAS e col., 1995). Na presença de fatores de indução linhagens-específicos, eles se diferenciam em células adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e osteogênicas (GESTA e cols., 2007)

Embora o número de estágios entre a célula mesenquimal tronco e o adipócito maduro seja incerto, acredita-se na formação de um precursor comum (adipoblasto ou pré-adipócito) que se diferencia em adipócitos maduros, brancos ou marrons, de acordo com o estímulo celular apropriado. Entretanto, nenhum precursor possui qualquer característica morfológica ou marcador de expressão que permite definir se existem diferentes adipoblastos para o TAM e TAB ou se existem diferentes adipoblastos brancos para diferentes depósitos (GREGORIE e cols., 1998; GREGORIE, 2001; WAJCHENBERG, 2001; GESTA e cols., 2007) (Figura 03).

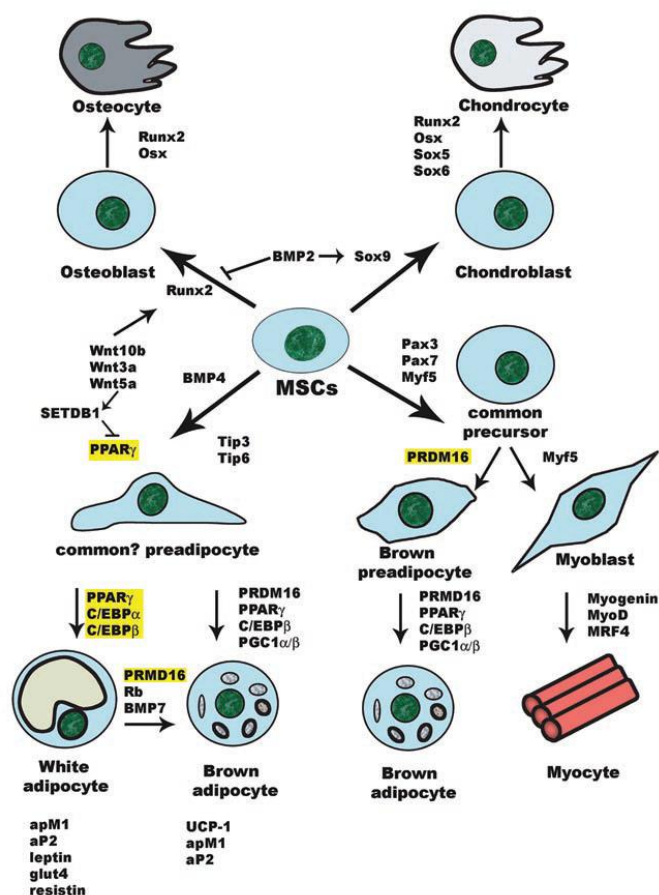


Figura 03: Diferenciação da célula mesenquimal tronco. A diferenciação da célula mesenquimal na linhagem condro-osteogênica depende da expressão do fator de transcrição Runx2. Proteínas Sox são o principal fator de transcrição que regula a diferenciação na linhagem condrogênica, bem como Runx2/ Cbfa1 e Osterix/ Osx participam na diferenciação de osteócitos e condrócitos. A via Wnt ativa Runx2 e induz o destino osteogênico, à custa da linhagem adipogênica. Por outro lado, BMP2 induz a expressão de Sox9, mas reprime Runx2, direcionando a célula mesenquimal para a condrogênese. O comprometimento com a linhagem miogênica e a miogênese são direcionados por fatores de transcrição músculo-específico, que incluem Myf5, MyoD, miogenina e MRF4, bem como a indução de TIP-1, enquanto a expressão de TIP-3 direciona a célula mesenquimal para a linhagem adipogênica. Os precursores miogênicos podem originar miócitos ou adipócitos marrons, dependendo da presença ou ausência do adipogênico PRDM16. Entretanto, os adipócitos brancos podem ser transdiferenciados em adipócitos marrons sob diferentes circunstâncias. Adaptado de MUSRI e cols., 2010.

Os C/EBPs são membros da família *b-zip* (domínio básico de ligação do DNA), que contém um domínio zíper de leucina necessário para a dimerização, constituídos por 5 membros (C/ EBP β , C/ EBP δ , C/ EBP α , C/ EBP γ e CHOP) com expressão sequencial observada durante a diferenciação (MUSRI e cols., 2007).

As isoformas do C/EBP α , β e δ são altamente expressas no adipócito e são induzidas durante a adipogênese. O C/EBP β e C/EBP δ são induzidos no início da adipogênese em resposta à estimulação hormonal e colaboram para a indução de outro fator de transcrição, o PPAR γ , cujo gene contém sítios C/EBP na sua região promotora (MUSRI e cols., 2007).

O C/EBP α tem um papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e atua na conversão de fibroblastos em adipócitos (FREYTAG e cols., 1994). No entanto, C/EBP α não é um sinal primário para a adipogênese, pois é induzido depois da expressão do PPAR γ , mas atua sinergicamente com este fator de transcrição para promover a diferenciação. O C/EBP α é requerido para a adipogênese do TAB (FARMER, 2006) e também exerce um papel na manutenção do fenótipo diferenciado da célula adiposa, provavelmente através da sua interação com a proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRB) (PUIGSERVER e cols., 1994). C/EBP α e PPAR γ se ligam à região promotora e ativam genes específicos do TAB, tais como a proteína ligadora de ácidos graxos (aP2 ou Fabp4) e genes da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (SPIEGELMAN e cols., 1996).

O PPAR γ é crucial para a adipogênese, sendo necessário e suficiente para a diferenciação, capaz de promover não somente a conversão de fibroblastos em adipócitos (TONTONNOZ e cols., 1994), mas também a transdiferenciação de mioblastos comprometidos em adipócitos (HU e cols., 1995). Os PPARs (α , β e γ) compõem uma superfamília de receptores nucleares e o PPAR γ possui 2 isoformas (PPAR γ 1 e PPAR γ 2), geradas por promotores distintos e mecanismos alternativos de *splicing*. (MORRISON e col., 1999, WU e cols., 1999; FARMER e cols., 2006; GESTA e cols., 2007). Estes fatores de transcrição formam heterodímeros com receptores de ácido retinóico (RXRs) que reconhecem e ligam a sequências específicas nos genes alvo e ativam a transcrição dos mesmos (KERSTEN e cols., 2000). O PPAR γ 1 é altamente expresso no TA e, em menor proporção, em outros tipos celulares, como macrófagos, pneumócitos e epitélio do cólon, enquanto o PPAR γ 2, é marcador específico da célula adiposa, branca e marrom, e da diferenciação terminal, pois é requerido para a manutenção do *status* de célula

diferenciada. Além disso, possui uma região amino-terminal com trinta aminoácidos a mais do que a isoforma 1.

Dado o papel central do PPAR γ no desenvolvimento do adipócito (e também na homeostase da glicose), o PPAR γ é alvo de drogas para o controle de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade (PALOU e cols., 2000).

A proteína SREBP é um fator de transcrição clonado originalmente do TA de rato, do tipo hélice-alça-hélice básico (bHLH) e contém uma região que forma um zíper de leucina, com importante papel na adipogênese, sensibilidade insulínica e homeostase dos ácidos graxos. A família do SREBP é composta de dois membros: o SREBP-1 e o SREBP-2. Contudo, existem duas isoformas do SREBP-1 (SREBP-1a e SREBP-1c), derivadas a partir de *splicing* alternativo do primeiro éxon dentro do mesmo transcrito primário. Os SREBPs 1a e 1c são controlados independentemente por regiões regulatórias que respondem diferentemente a fatores orgânicos e metabólicos específicos (KIM e cols., 1998).

O fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1) é homólogo à isoforma SREBP-1c de humanos. O SREBP-1c/ADD1 é predominantemente expresso em fígado, glândula adrenal, TA e músculo esquelético, enquanto o SREBP-1a, no baço. O principal papel do SREBP-2 é controlar a biossíntese de colesterol. *In vitro*, o ADD1/SREBP-1c aumenta a atividade transcricional do PPAR γ , elevando a proporção de células submetidas ao processo de diferenciação (KIM e cols., 1998).

Um co-ativador do PPAR γ , o PGC-1 (PUIGSERVER e cols., 1998), mostrou-se importante na bifurcação no desenvolvimento entre adipócitos brancos e marrons (WU e cols., 1999; LOWELL e col., 2000). O PGC-1 é expresso em níveis elevados nos adipócitos marrons, mas não nos brancos, e encontrado também em outros tecidos, como coração, rim, cérebro e músculo esquelético. Este fator foi relacionado inicialmente à termogênese adaptativa por causa de sua indução rápida no TAM e músculo após exposição de camundongos ao frio. Além do PPAR γ , o PGC-1 liga a diversos receptores nucleares, incluindo receptores do ácido retinóico e de hormônios da tireóide, regulando positivamente a expressão da UCP1 (PALOU e cols., 1998).

Os pré-adipócitos dos dois tipos celulares (branco ou marrom) são marcados pela expressão do *Pref-1* (ou *Dlk*), sintetizado como uma proteína transmembrana que, quando clivado para a forma solúvel, inibe a diferenciação. Entretanto, seus níveis de expressão são reduzidos quando os pré-adipócitos se tornam diferenciados (GESTA e cols., 2007).

Já está documentada a participação da leptina e resistina na diferenciação do pré-adipócito em TAB. Entretanto, no TAM, depois do direcionamento mediado inicialmente por PGC-1, ocorre aumento na expressão de PRMD16, que estimula a expressão de genes específicos do tecido, como UCP1, e, ao mesmo tempo, reprime genes característicos do TAB, como a resistina. O PRDM16 estimula a transcrição de genes envolvidos com a termogênese (*UCP1*, *Dio2* e *PGC1 α*), com a fosforilação oxidativa (*Cox8b*), que regulam a atividade desacopladora da UCP1 (*Cidea*) e a síntese de ácidos graxos por aumento da transcrição de *Elovl3* (WOLF, 2009).

De fato, o TAB de adultos humanos possui células semelhantes a fibroblastos (pré-adipócitos) e precursores multipotentes, o que evidencia a sua plasticidade (GESTA e cols., 2007). Todavia, o número de células do TAB reflete o balanço entre a proliferação e apoptose de pré-adipócitos, bem como a diferenciação e apoptose de adipócitos (TCHOUKALOVA e cols., 2004).

1.4 Inervação simpática para o TAB e TAM

Numa condição fisiológica, em que os carboidratos circulantes ou estocados não são suficientes para atender a demanda energética, sinalizações neuronais mediadas por catecolaminas estimulam a lipólise no TA (COUSIN e cols., 1993b; BAMSHAD e cols., 1998; BARTNESS e col., 1998).

A membrana celular do TAB possui 4 tipos de adrenoreceptores envolvidos no controle da lipólise: β_1 , β_2 , β_3 e α_2 (LAFONTAN, 1994; LAFONTANE e col., 1995a; LAFONTANE e cols., 1995b). No mesmo depósito existem os 4 subtipos e todos são responsivos às catecolaminas, diferindo apenas no efeito sobre os níveis do segundo mensageiro AMPc, envolvido na ativação da proteína-quinase dependente de cAMP (PKA). A norepinefrina (NE), neurotransmissor pós-ganglionar primário do

SNS, estimula a lipólise do TAB quando atua em β -adrenoceptores, pois ativa o cAMP e desencadeia a cascata de eventos moleculares que culminam na ativação da lipase lipoprotéica, a qual cliva os TAG em monoacilglicerol, que são clivados posteriormente em glicerol e ácidos graxos livres. A ativação dos α -receptores inibe o cAMP e, conseqüentemente, a lipólise, influenciando a proliferação de adipócitos (BARTNESS e col., 1998; BOWERS e cols., 2004; FOSTER e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2008). O balanço entre estes subtipos define a predominância ou não da lipólise e a participação de cada um varia com o depósito, espécie, gênero, idade e grau de obesidade (LAFONTANE e cols., 1995b BOWERS e cols., 2004).

Sendo assim, diferenças regionais na inervação do SNS ou no fluxo podem explicar diferenças regionais na adiposidade via taxas distintas de lipólise e via controle diferencial da proliferação das células de gordura, fundamentando as diferenças nas capacidades proliferativas dos depósitos de gordura *in vivo* (BOWERS e cols., 2004; FOSTER e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2008). Todavia, o mecanismo pelo qual a adipogênese é influenciada pelo fluxo simpático não foi proposto.

Os adipócitos marrons são densamente inervados pelo SNS e os efeitos diretos da atividade simpática sobre o TAM são mais evidentes, uma vez que a termogênese ocorre em resposta ao estímulo simpático (COUSIN e cols., 1993b; SUSULIC e cols., 1995; PALOU e cols., 1998; BAMSHAD e cols., 1999; LOWELL e col., 2000; CANNON e cols., 2004; SILVA, 2006; SEALE e cols., 2009; WOLF, 2009). A produção de calor pelo TAM é estimulada pelo frio e pela dieta (ROTHWELL e col., 1979; NICHOLLS e col., 1984; PALOU e cols., 2000; WOLF, 2009). A NE liberada pelo SNS exerce seu efeito nos adipócitos marrons estimulando a atividade e a síntese da UCP1, além da divisão celular (CANNON e cols., 1996; PALOU e cols., 1998; KLINGENSPOR, 2003; CANNON e col., 2004). Os subtipos de adrenoceptores presentes nos adipócitos marrons são, predominantemente, α_1 , β_1 e β_3 , mas o efeito da NE é via receptores do subtipo β_3 (CHERNOGUBOVA e cols., 2005). Agindo via receptores adrenérgicos β_3 , a NE eleva os níveis intracelulares de cAMP (CANNON e col., 1990; ZHAO e cols., 1994;

PUIGSERVER e cols., 1996) e afeta a transcrição do gene UCP1 e de outro fatores termogênicos do TAM (BIANCO e col., 1987; RIBEIRO e cols., 2001).

O TAM tem mostrado um importante papel na regulação da homeostase da glicose e secreção de insulina, decorrente do estímulo simpático (GUERRA e cols., 2001). A absorção de glicose é aumentada no TAM *in vivo* pela ativação simpática, independentemente da insulina (SHIMIZU e cols., 1991; LIU e cols., 1994) e *in vitro* por agonistas adrenérgicos (MARETTE e col., 1989; LIU e cols., 1998; CHERNOGUBOVA e cols., 2004; CHERNOGUBOVA e cols., 2005). O mecanismo proposto por HUTCHINSON e cols. (2005) sugere que a NE aumenta a fosforilação da PKA, provavelmente via elevação nos níveis de cAMP, que é responsável parcialmente pelo aumento da absorção de glicose, uma resposta independente da expressão e função da UCP1 (HUTCHINSON e cols., 2005). Dessa forma, as catecolaminas, assim como no TAB, estimulam a proliferação e diferenciação de precursores de adipócitos marrons tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GÉLÖEN e cols., 1988; REHNMARK e cols., 1990; KLAUS e cols., 1991; COUSIN e cols., 1993b; WOLF, 2009).

1.5 Indução da obesidade pela dieta hiperglicídica

A obesidade tem sido estudada a partir de diversos modelos experimentais, genéticos ou exógenos, que auxiliam na determinação dos elementos envolvidos na fisiopatologia da doença. Os modelos genéticos podem ser devido a alterações monogênicas ou poligênicas em cromossomos envolvidos com a produção de peptídeos anorexígenos ou orexígenos, ou a produção de modelos transgênicos e/ou *knock-out* de genes candidatos, como, por exemplo, o gene *ob* ou receptores de leptina e insulina, interferindo na transdução do sinal desses hormônios (CESARETTI e cols., 2006). O uso de dietas ocidentalizadas, de *fast food*, de cafeteria, hipercalóricas ou palatáveis, tem sido utilizado com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade e síndrome plurimetabólica. Por serem prontamente aceitáveis, são espontaneamente substituídas pela ração padrão, o que resulta em elevação do peso corporal e da gordura visceral, provocando resistência à insulina e hiperleptinemia nestes animais (COOPER e

cols., 1985; DUARTE e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2003b; BRITO e cols., 2006; DE LIMA e cols., 2008).

O excesso de carboidratos da dieta aumenta a taxa de síntese de ácidos graxos no TAB, bem como a sua síntese, resultando em acumulação de gordura corporal (CHAVES e cols., 2006). Em ratos alimentados com dieta de cafeteria, rica em carboidratos e lipídeos, ocorre aumento nos depósitos retroperitoneal e epididimal e na geração de glicerol-3-fosfato (G3P) pelo glicerol (FESTUCCIA e cols., 2003a; FESTUCCIA e cols., 2003b; BRITO e cols., 2006). Além disso, foi demonstrado que o alto conteúdo de carboidratos da dieta ativa o fluxo simpático tanto para o tecido adiposo marrom quanto para o branco, influenciando a sua celularidade (LEVIN, 1992; MIGLIORINI e cols., 1997; BOWERS e cols., 2004; CANNON e cols., 2004; CHAVES e cols., 2006; SILVA, 2006; FESTUCCIA e cols., 2008).

Modelos experimentais alimentados com dietas de cafeteria apresentam, em longo prazo, hiperplasia do TAM e aumento nos níveis de UCP1 (PUIGSERVER e cols., 1991; PUIGSERVER e cols., 1992; ROCA e cols., 1999), uma resposta que confere uma proteção relativa contra o desenvolvimento da obesidade e depende, inicialmente, de estimulação do SNS (ROTHWELL e col., 1979; HIMMS-HAGEN e cols., 1991; SEALE e cols., 2009). Geralmente, a termogênese no TAM pode ser regulada a partir de mudanças intrínsecas na atividade da UCP1 (segundos), na quantidade de UCP1 (horas), no número de mitocôndrias e adipócitos (dias) ou na hiperplasia generalizada do TAM (semanas) (HIMMS-HAGEN e cols., 1991; CANNON e cols., 1996). Entretanto, a termogênese adaptativa é deficiente em quase todos os modelos de obesidade estudados (HIMMS-HAGEN e cols., 1989; SUSULIC e col., 1995; SEALE e cols., 2009).

Por outro lado, a associação entre dieta e treinamento físico tem sido pouco abordada. Os trabalhos descritos na literatura relatam apenas os efeitos da dieta ou do treinamento sobre o metabolismo de forma isolada (MIYAZAKI e cols., 2010), não correlacionando as consequências do tipo de alimentação sobre a eficácia de um programa de exercício físico. Sabe-se que uma superexcitação simpática está associada a doenças cardiovasculares, como hipertensão e insuficiência cardíaca

(MÜELLER, 2007) e evidências experimentais indicam que a atividade física reduz o barorreflexo e outras formas de simpatoexcitação em animais normais (NEGRÃO e cols., 1993; KRIEGER e cols., 1999; KRIEGER e cols., 2001; MÜELLER, 2007). Entretanto, o mecanismo pelo qual o exercício altera o controle da atividade simpática permanece por ser elucidado e o papel dessa alteração sobre a adipogênese não tem sido descrito.

Apesar do fenótipo associado à obesidade ser conhecido desde meados de 1980, o mecanismo pelo qual acontece a distribuição dos adipócitos no corpo ainda é um mistério. Ainda, a influência do ambiente nutricional sobre a distribuição destes depósitos é pouco abordada. Portanto, a hipótese deste trabalho é que o modelo de obesidade induzido por dieta hiperglicídica associado ao treinamento físico em esteira pode induzir alterações no metabolismo de lipídeos e favorecer a adipogênese tanto no TAB como no TAM.

II OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral determinar o efeito da dieta hiperglicídica na distribuição do TA e no metabolismo de ratos submetidos ao treinamento físico em esteira.

Para isso, foram abordados os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratos Wistar;
2. Analisar o efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre a distribuição dos coxins adiposos;
3. Avaliar o impacto da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o grau de obesidade;
4. Comparar o efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre o desempenho físico dos animais;
5. Determinar o efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre os níveis plasmáticos de leptina, insulina e NEFAs;
6. Analisar a expressão gênica relativa de *Ucp1*, *Adra2*, *Adrb3* no TAM, além de *Leptina*, *rLep*, *rIns*, *Ucp2*, *Adra2* e *Adrb3* no TA retroperitoneal.

III METODOLOGIA

III.1 Estabelecimento do modelo experimental

III.1.1 Animais e dieta hiperglicídica (palatável)

Foram utilizados ratos Wistar recém-desmamados (aproximadamente 28 dias) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto e do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos experimentais apresentados foram aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação de ambas as Universidades, sob o protocolo nº192/08 e nº. 100/07, respectivamente.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: 1) grupo dieta controle balanceada sedentário (CS) (n=36), os quais foram alimentados com ração comercial balanceada Nuvilab - CR e 2) grupo dieta hiperglicídica sedentário (DS) (n=36), cuja constituição e composição nutricional estão representadas na tabela abaixo (Tabela 01) (COOPER e cols., 1985; DE LIMA e cols., 2008):

Tabela 01: Constituição e composição nutricional das rações.

Dieta Controle	Composição Nutricional	Dieta Hiperglicídica	Composição Nutricional
Ração Comercial Nuvilab – CR	292 kcal/ 100g 57,5% Carboidratos 30% Proteínas 12,5% Lipídeos 12,5% Umidade	33% Ração Nuvilab 33% Leite Condensado 7% Açúcar Cristal 8,6% Água	318 kcal/ 100g 68% Carboidratos 16% Proteínas 16% Lipídeos 27% Umidade

Dieta controle (g/100g de dieta): Ração NUVILAB – CR (carboidrato, 44g; proteína, 22g; lipídeo, 4g).

Dieta hipercalórica (g/100g de dieta): Ração NUVILAB – CR (carboidrato, 44g; proteína, 22g; lipídeo, 4g); Leite condensado – Moça, Nestlé (carboidrato, 57g; proteína, 7g; lipídeo, 8g); Açúcar cristal (carboidrato, 99g; proteína, 0g; lipídeo, 0g).

Os efeitos da dieta foram avaliados durante cinco (n=12) e nove semanas (n=6). Os animais foram sacrificados por decapitação e os coxins adiposos (epididimal, retroperitoneal, inguinal e intraescapular) foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posteriores análises.

III.1.2 Protocolo de treinamento físico em esteira

O treinamento físico foi realizado em esteira (Gaustec, Contagem, Brasil) com inclinação fixa de 5°.

Os grupos CS e DS foram subdivididos em dieta controle balanceada treinado em esteira (CTE) (n=12) e dieta hiperglicídica treinado em esteira (DTE) (n=24), sendo sacrificados após quatro (n=12) ou oito semanas (n=6) de treinamento e cinco ou nove semanas de dieta. O treinamento físico em esteira foi realizado cinco vezes por semana.

Os animais recém-desmamados de ambos os grupos, inclusive os respectivos controles, foram submetidos a quatro dias de adaptação ao treinamento físico em esteira, realizando uma sessão diária de exercício com duração de 5 minutos e velocidade constante de 10 m/ min. No quinto dia, foi realizada a avaliação da capacidade física de cada animal pelo exercício progressivo na esteira até a fadiga. Essa avaliação iniciou com velocidade de 10m/ min., acrescida de 1m/ min. a cada 3 minutos (Tabela 02). A estimulação elétrica foi ajustada para um valor suficiente que causasse um desconforto ao animal, de modo que preferisse correr a estacionar na grade de estimulação elétrica (~0,7 mA).

Tabela 02: Protocolo de treinamento na semana de adaptação e teste progressivo.

Semana de Adaptação			Teste Progressivo			
Velocidade	Tempo	Dias	Dia	Velocidade	Tempo	Acréscimo
10 m/ min.	5 minutos	4	5º	10 m/ min.	3 minutos	1 m/ min.

A Figura 04 ilustra o delineamento desta etapa:

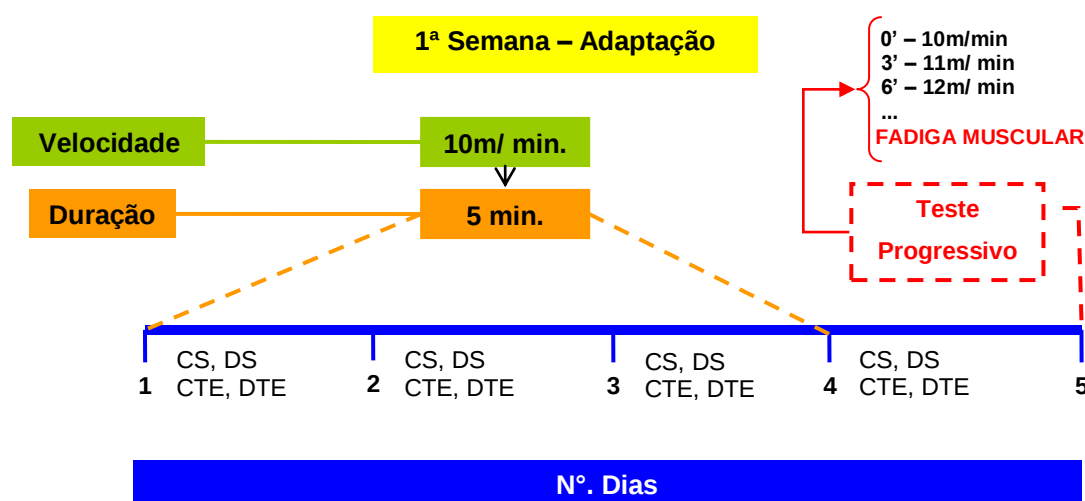


Figura 04: Semana de adaptação dos animais recém-desmamados. Os animais recém-desmamados e seus respectivos controles foram submetidos a quatro dias de adaptação ao treinamento físico em esteira, sendo realizado no quinto dia o teste do esforço progressivo até o ponto de fadiga.

Constituiu como fadiga o momento em que o animal não conseguiu manter a cadência da corrida, preferindo ficar na grade de estimulação elétrica por mais de 10 segundos consecutivos. Equivaliu à capacidade máxima aquela correspondente ao trabalho total realizado pelos animais, a qual foi calculada a partir da seguinte equação:

Onde:

W: Trabalho (kgm);

PC: Peso Corporal (kg);

t: Tempo até a Fadiga (minutos);

V: Velocidade da Esteira durante a fadiga (m/ min.);

θ : Inclinação da Esteira (Ângulo de 5°).

$$W = PC \times t \times V \times \sin \theta$$

A partir da primeira semana de treinamento físico em esteira, houve variações na velocidade do exercício ou na duração do mesmo ou em ambos, a fim de se alterar a intensidade do treinamento em esteira com o decorrer do tempo, como demonstrado pela tabela abaixo (Tabela 03). Os animais submetidos a 4 semanas

de treinamento em esteira realizaram o protocolo descrito abaixo até a quarta semana.

Tabela 03: Protocolo de treinamento físico em esteira dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento.

		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1ª Semana	Velocidade	10 m/ min.	11 m/ min.	12 m/ min.	12 m/ min.	12 m/ min.
	Tempo	30 minutos	30 minutos	30 minutos	35 minutos	35 minutos
2ª Semana	Velocidade	12 m/ min.	12 m/ min.	12 m/ min.	12 m/ min.	12 m/ min.
	Tempo	35 minutos	40 minutos	45 minutos	45 minutos	50 minutos
3ª Semana	Velocidade	12 m/ min.	13 m/ min.	14 m/ min.	14 m/ min.	14 m/ min.
	Tempo	50 minutos	50 minutos	50 minutos	55 minutos	55 minutos
4ª Semana	Velocidade	14 m/ min.	14 m/ min.	15 m/ min.	15 m/ min.*	15 m/ min.*
	Tempo	55 minutos	55 minutos	55 minutos	55 minutos	60 minutos
5ª Semana	Velocidade	15 m/ min.	15 m/ min.	16 m/ min.	16 m/ min.	16 m/ min.
	Tempo	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
6ª Semana	Velocidade	16 m/ min.	16 m/ min.	17 m/ min.	17 m/ min.	17 m/ min.
	Tempo	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
7ª Semana	Velocidade	17 m/ min.	18 m/ min.	18 m/ min.	19 m/ min.	20 m/ min.
	Tempo	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
8ª Semana	Velocidade	21 m/ min.	22 m/ min.	23 m/ min.	Exercício	
	Tempo	60 minutos	60 minutos	60 minutos	Progressivo	Sacrifício

*Os animais submetidos a 4 semanas de treinamento em esteira realizaram o exercício progressivo no quarto dia da quarta semana e *foram sacrificados no quinto dia da quarta semana.

No dia anterior ao sacrifício, os animais foram submetidos novamente ao exercício progressivo, a fim de se avaliar se o houve melhora no desempenho físico daqueles submetidos ao treinamento em esteira.

III.2 Efeito da dieta sobre a distribuição dos depósitos adiposos

Durante 5 e 9 semanas, os animais foram monitorados para avaliação do peso corporal e do consumo alimentar. Após o sacrifício, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, inguinal e intraescapular (massa gorda) foram dissecados e pesados. O grau de obesidade foi avaliado pelo índice de Lee (LEE e cols., 1929) e pelo índice de adiposidade (LEVIN, 1992), segundo as fórmulas abaixo:

Índice de Lee:

$$\frac{{}^3\sqrt{\text{PC}}}{\text{CNA}} \times 10$$

Onde:

${}^3\sqrt{\text{PC}}$: Raiz Cúbica do Peso Corporal (g);
CNA: Comprimento Naso-Anal (mm).

Índice de Adiposidade:

$$\frac{\text{MG}}{\text{MM}} \times 100$$

Onde:

MG: Peso Absoluto da Massa Gorda (g);
MM: Peso Absoluto da Massa Magra (g).

O animal foi considerado obeso quando houve diferença entre o índice de Lee e/ ou o houve correlação positiva entre o ganho de peso corporal e o índice de adiposidade (coeficiente de Pearson).

III.3 Efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre parâmetros bioquímicos

III.3.1 Efeito da dieta sobre os níveis plasmáticos de insulina, leptina e ácidos graxos não-esterificados (NEFAs)

Após decapitação, amostras de sangue dos animais foram colhidas em tubos *ependorfs* para análise do conteúdo plasmático de insulina, leptina e ácidos graxos livres. O plasma foi separado por centrifugação e mantido congelado a -20 °C até a realização dos ensaios.

Os níveis de insulina e de leptina foram determinados quantitativamente por radioimunoensaio pelos kits *Rat Insulin RIA* (Millipore, RI-13K) e *Rat Leptin RIA* (Linco Research, RL-83K), enquanto os níveis de NEFAs foram determinados pelo método colorimétrico pelo kit *NEFA* (Randox $\subset \in$, FA115), conforme orientações dos fabricantes.

Brevemente, o princípio do método do radioimunoensaio baseia-se na competição para a ligação com o anticorpo anti-insulina e anti-leptina da insulina e leptina marcadas radioativamente. O ensaio da insulina foi realizado em dois dias e o da leptina em três. Após a separação total do hormônio radioativo livre, a radioatividade emitida pela amostra foi medida por meio de um contador de raios gama (modelo ANSR-ABBOTT). Os valores foram calculados utilizando-se uma curva padrão de insulina e leptina de rato, sendo expressos em ng/mL.

O método colorimétrico determinou a concentração de NEFAs pela absorção de luz no comprimento de onda a 550nm. Foi realizada uma curva calibradora e feita a relação entre as absorbâncias da amostra e padrão, multiplicada pela concentração do padrão, para se obter a concentração de NEFAs da amostra, expressa em mmol/L.

III.4 Análise da expressão gênica por qRT-PCR (Real time)

III.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes em estudo foram baseados nas sequências de mRNA depositadas no banco de dados RGD (*Rat Genome Database*, disponível em <http://rgd.mcw.edu/>) e foram idealizados pelo programa *Gene Runner (Version 3.05)*, conforme a tabela abaixo (Tabela 04):

Tabela 04: Número de acesso ao RGD das sequências de *primers forward* (F') e *reverse* (R') referentes aos genes avaliados, temperatura de melting (T_m) e tamanho do *amplicon* gerado.

Gene	Nº de acesso	Primer	T _m (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>rRNA18S</i>	X01117.1	F' GTAAGTGC GGGTCATAAG R' CCATCCAATCGGTAGTAGC	42,4 47	80
<i>Adra2</i>	NM_012739.2	F' CTCTTCCTGGTGTCTCTG R' CCAGTAGCCCAT AACCTC	41,1 44	90
<i>Adrb3</i>	NM_013108.1	F' CACGCCGAGACTACAGAC R' TTACGAGGAGTCCCACTAC	45,5 43,6	80
<i>Ucp1</i>	NM_012682.1	F' CAAAGTCCGCCTTCAGATC R' TGGTGATGGTCCCTAAGAC	49,6 46,6	80
<i>Ucp2</i>	NM_019354.2	F' CTGGCGGTGGTCGGAGATAC R' GGGCAACATTGGGAGAGGTC	56,7 55,5	80
<i>Leptina</i>	NM_013076.2	F' CAGGCTCTCTGGCTTCTG R' GAGACCTCCTCCATCTGCTG	52,4 51	80
<i>rLep</i>	NM_012596.1	F' GAACCTGTGAGGATGAGTG R' CACTGGCTGACAGAACTATG	45,1 44	121
<i>rIns</i>	NM_017071.1	F' CCTTGGATCGTTCTCTCAC R' GGTCCGTTTGATGCTCAGAG	50,9 52	80

III.4.2 Extração de RNA total

Cerca de 200mg dos tecidos adiposos (retroperitoneal e marrom), foram utilizados para obtenção do RNA total utilizando o kit SV total RNA Isolation System (PromegaTM) seguindo as recomendações do protocolo do fabricante.

Brevemente, 200mg de tecido foram homogeneizados com auxílio de um homogeneizador do tipo politron (Homogeneizador ultra 80) com 1mL de Trizol[®] Reagent (InvitrogenTM) em 5 pulsos de 1 minuto cada, seguidos de 30 segundos em banho de gelo. Depois de 20 minutos incubados a temperatura ambiente, foram adicionados 0,4 mL de clorofórmio (Sigma - St. Louis, MO, USA) e homogeneizados por 1 minuto com auxílio de um agitador tipo vórtex, seguido de uma incubação a temperatura ambiente por 25 minutos. A seguir, os homogenatos foram centrifugados durante 15 minutos a 12000g. A fase aquosa foi recuperada, transferida para um novo tubo e foram adicionados mais 0,4 mL de clorofórmio (Sigma - St. Louis, MO, USA), seguido de nova homogeneização por 1 minuto com auxílio de um agitador tipo vórtex e por centrifugação durante 2 minutos a 12000g. Após recuperar a fase aquosa, foram adicionados 0,6 mL de etanol 95% v/v (preparado com água livre de RNAses) para precipitar os ácidos nucleicos e

transferidos para a coluna de ligação que acompanha o kit. Em seguida, o RNA total foi purificado com o kit SV total RNA Isolation System (Promega™) conforme instrução do boletim técnico. O controle de qualidade do RNA foi realizado a partir da quantificação e avaliação do grau de pureza do mesmo pelo aparelho NanoVue® (GE), seguidas da análise das preparações em gel de agarose 1,2% TBE-formamida (Figura 05). 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 da pureza, e a relação 260/230 indicativa de contaminação. As razões acima de 1,8 foram aceitas como adequadas para a quantificação da expressão gênica (MANCHESTER, 1996; GALLAGHER e cols., 2006; BECKER e cols., 2010).

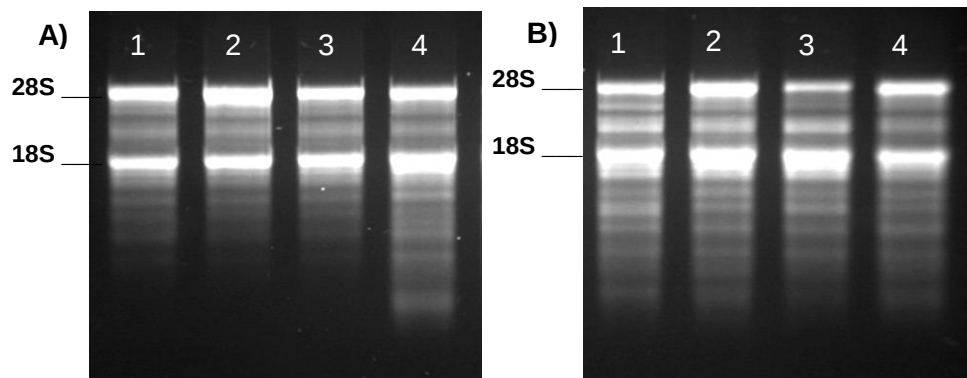


Figura 05: Análise da qualidade do RNA total de animais submetidos a 4 semanas de treinamento físico em esteira em gel de agarose/formamida a 1,2%. O RNA total foi obtido a partir dos tecidos adiposos retroperitoneal (A) e marrom (B) dos grupos CS (1), DS (2), CTE (3) e DTE (4).

III.4.3 RT-PCR e obtenção dos cDNAs

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 as recomendações dadas pelo fabricante.

Para cada 1 µg de RNA total, foram utilizados 2 µL de *primers* randômicos (10x RT *Random primer*), 0,8 µL de dNTPs [25x dNTP Mix (100mM)] 1 µL de transcriptase reversa (Multi Scribe™ Reverse Transcriptase) e água livre de RNase

para um volume final de 10 μ L. A mistura de reação foi preparada e, adicionados o volume de RNA (10 μ L), foi mantida em 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 37°C e 85°C por 5 minutos. A amostra ficou estocada a -20°C até o momento do uso.

III.4.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (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[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp[™] Optical Adhesive Film – Applied Biosystems) ao final do procedimento. Foram pipetados 3 μ L dos iniciadores (na concentração de 2,5 μ M) em triplicata e 7 μ L de um mix de reação contendo 2 μ L de cDNA diluído 5x (com água livre de DNase) e 5 μ L de SYBR[®] Green Master Mix, totalizando um volume de reação em cada poço de 10 μ L. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados, com o gene de referência (*rRNA18S*) presente em todas as placas. 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 relativa da expressão gênica (C_q comparativo ou $\Delta\Delta C_q$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre as diferentes amostras. Os níveis dos genes alvos foram normalizados pelos níveis do gene de referência (*rRNA18S*) e uma amostra calibradora (grupo CS) foi utilizada como base para resultados de expressão comparativa. O calibrador foi considerado uma amostra 1x e todas as outras quantidades foram expressas como uma diferença *n*-vezes em relação a ele. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo, normalizado para o gene de referência em relação ao calibrador, dada por $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Para utilizar o método do C_q comparativo, foi necessário realizar um

experimento de validação, no qual a eficiência da amplificação do alvo e a eficiência da amplificação do controle endógeno deveriam ser aproximadamente iguais.

A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems.

III.4.4.1 Curva de eficiência dos *primers*

Para determinar as eficiências relativas 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 e a concentração dos iniciadores foi de 2,5 μ M.

A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-*log* do valor de C_q (eixo Y) em comparação ao *log* da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X). Foi utilizado o cDNA de TAM e TAB em 5 diluições seriadas de 4 vezes. A Figura 06 ilustra o gráfico de amplificação do gene *Ucp1* e a Figura 07 a curva padrão do mesmo gene, indicando um resultado esperado de um *primer* com eficiência próxima a 100%.

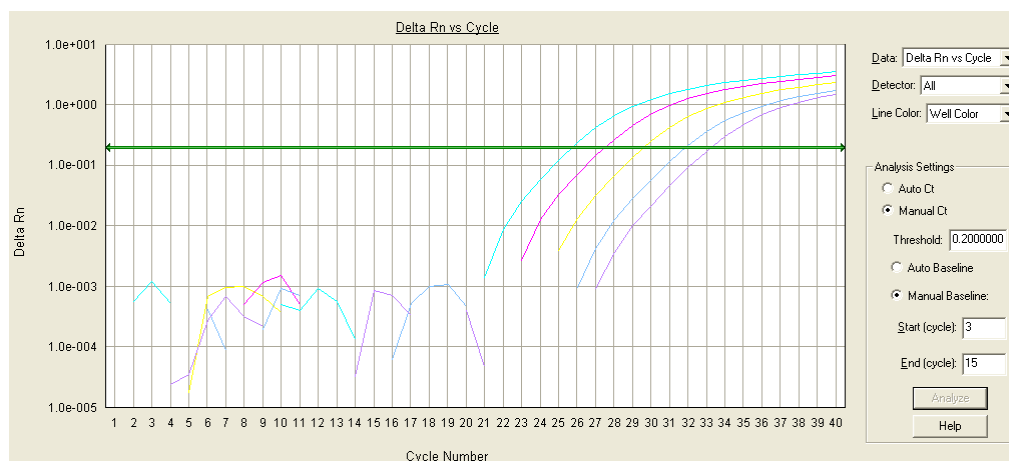


Figura 06: Gráfico de amplificação referente à curva de eficiência do gene *Ucp1* utilizando diluição seriada de 4x de cDNA do TAM. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de ΔRn . As intercessões da linha verde com as curvas indicam o C_q da curva de amplificação.

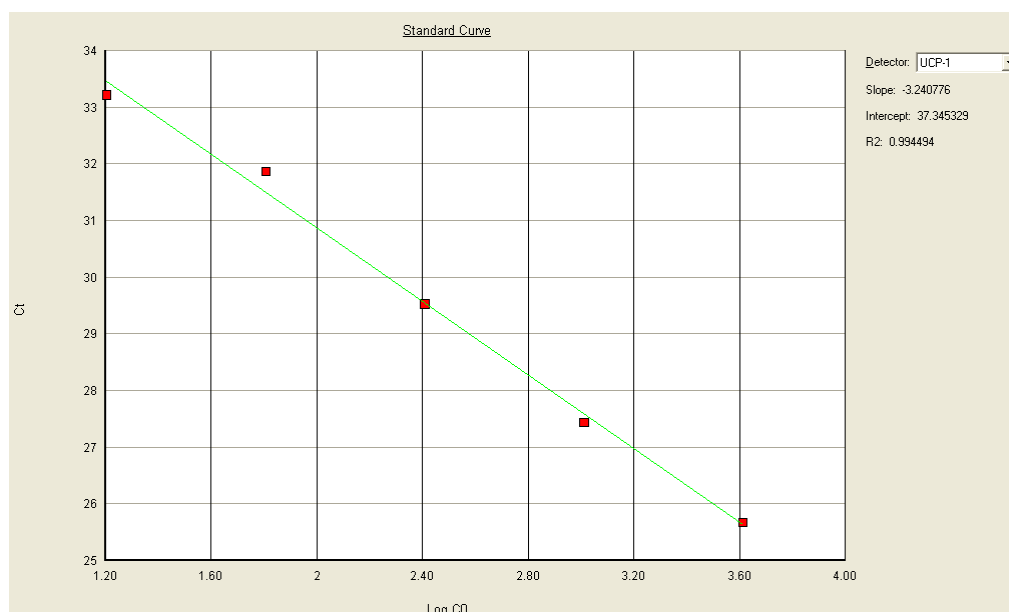


Figura 07: Curva padrão referente ao gene Ucp1 utilizando diluição seriada de 4x de cDNA do TAM. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de Cq correspondes a cada diluição.

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 calculado pela fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Os *primers* foram considerados apropriados para avaliar a expressão gênica pelo sistema SYBR[®] Green quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3-15 ciclos e o *threshold* fixado em 0,2 para todas as amostras. A Tabela 05 mostra os valores de *slope* e as eficiências dos *primers* avaliados.

Tabela 05: Sequências de *primers forward* (F') e *reverse* (R'), *slope*, eficiência de reação e coeficiente de correlação (R^2) referentes aos genes avaliados.

Gene	Primer	Slope	Eficiência do primer (%)	R^2
<i>rRNA18S</i>	F' GTAAGTGC GGTCATAAG R' CCATCCAATCGGTAGTAGC	-3,32	100	0,9998
<i>Adra2</i>	F' CTCTTCCTGGTGTCTCTG R' CCAGTAGCCCATAACCTC	-3,33	100	0,9806
<i>Adrb3</i>	F' CACGCCGAGACTACAGAC R' TTACGAGGAGTCCCCTACTAC	-3,15	108	0,9923
<i>Ucp1</i>	F' CAAAGTCCGCCTTCAGATC R' TGGTGATGGTCCCTAAGAC	-3,24	104	0,9947
<i>Ucp2</i>	F' CTGGCGGTGGTCCGAGATAC R' GGGCAACATTGGGAGAGGTC	-3,11	110	0,9757
<i>Leptina</i>	F' CAGGCTCTCTGGCTTCTG R' GAGACCTCCTCCATCTGCTG	-3,12	109	0,9988
<i>rLep</i>	F' GAACCTGTGAGGATGAGTG R' CACTGGCTGACAGAACTATG	-2,94	120	0,9192
<i>rIns</i>	F' CCTTGGATCGTTCCTCTCAC R' GGTCCGTTTGATGCTCAGAG	-3,18	106	0,9945

III.4.4.2 Curva de dissociação dos *amplicons*

Foi realizada a análise da curva de dissociação dos *amplicons*, conforme os *guidelines* para real time (MIQE), para identificar a formação de produtos inespecíficos no final de cada corrida, possivelmente gerados a partir de excesso de *primers* ou falha no desenho dos mesmos. A Figura 08 ilustra a curva de dissociação do gene *Ucp1*, indicando a ocorrência de um único pico à temperatura próxima de 80°C, mostrando não haver contaminação ou formação de produtos inespecíficos.

Ao final dos 40 ciclos da qRT-PCR, a temperatura foi elevada gradualmente de 60 à 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada grau Celsius. Na medida em que os *amplicons* desnaturaram, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR® *Green* foi reduzido e a temperatura em que metade do produto da PCR estava dissociada medida. O gráfico resultante permitiu verificar se houve um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de temperatura de *melting* (T_m), específicas e dependentes do tamanho do fragmento e do conteúdo de GC (%GC). O T_m desejado foi em torno de 80°C.

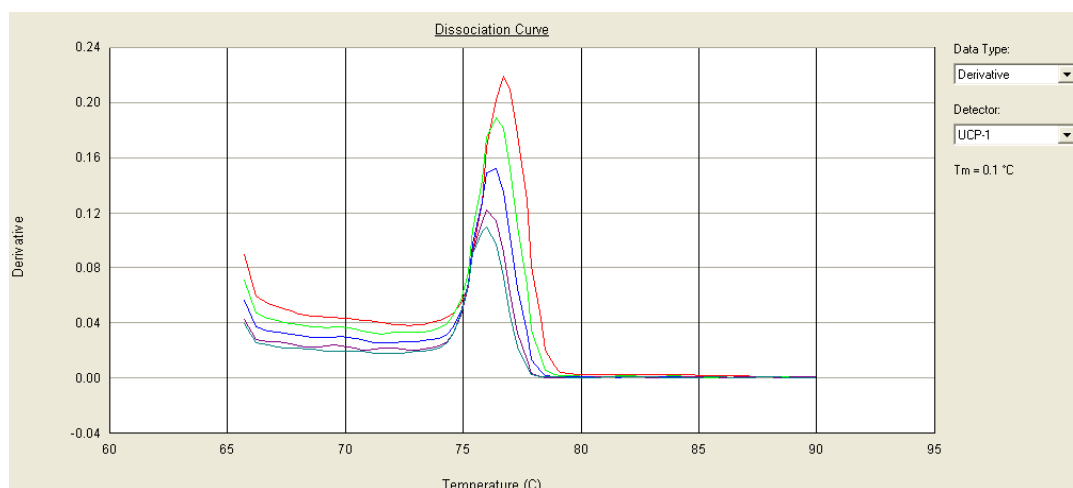


Figura 08: Curva de dissociação referente ao amplicon do primer Ucp1. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do *amplicon* gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

III.4.4.3 Experimento de validação do $\Delta\Delta C_q$

Para determinar se as reações de amplificação apresentavam a mesma eficiência, foi observada a maneira em que o ΔC_q ($C_{q \text{ alvo}} - C_{q \text{ referência}}$) variava com a diluição da amostra (cDNA do TAM ou TAB).

A avaliação das eficiências relativas da amplificação do alvo e da amplificação do gene de referência foi alcançada pela corrida de curvas padrões para cada *amplicon* utilizando a mesma amostra. A amostra no experimento de validação expressava ambos os genes alvo e gene de referência. Os valores de C_q gerados a partir dos pontos de massa da curva padrão equivalente (alvo em comparação a referência) foram usados no cálculo do ΔC_q . Os valores foram colocados em gráfico em comparação ao $\log$ de entrada para criar uma regressão linear semi- $\log$. O *slope* da regressão linear semi- $\log$ foi utilizado como critério geral para o experimento de validação, cujo valor absoluto foi menor ou igual a -1. A Tabela 06 demonstra os resultados obtidos.

Tabela 06: Valores de *slope* dos genes avaliados para validar o uso do método do $\Delta\Delta C_q$.

Gene	Primer	Slope
<i>Adra2</i>	F' CTCTTCCTGGTGTCTCTG	-1
	R' CCAGTAGCCCATAACCTC	
<i>Adrb3</i>	F' CACGCCGAGACTACAGAC	-1,66
	R' TTACGAGGAGTCCCACTAC	
<i>Ucp1</i>	F' CAAAGTCCGCCTTCAGATC	-1,25
	R' TGGTGATGGTCCCTAAGAC	
<i>Ucp2</i>	F' CTGGCGGTGGTCGGAGATAC	-1,13
	R' GGGCAACATTGGGAGAGGTC	
<i>Leptina</i>	F' CAGGCTCTCTGGCTTCTG	-1
	R' GAGACCTCCTCCATCTGCTG	
<i>rLep</i>	F' GAACCTGTGAGGATGAGTG	-1,4
	R' CACTGGCTGACAGAACTATG	
<i>rIns</i>	F' CCTTGGATCGTTCCTCTCAC	-1,69
	R' GGTCCGTTTGATGCTCAGAG	

III.5 Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk. O efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre os depósitos adiposos, grau de obesidade, teste de esforço e expressão gênica relativa foi avaliado pela análise da variância (ANOVA) por TWO-WAY (Teste de Bonferroni). Para análise do índice de adiposidade foi realizado, ainda, o cálculo da regressão linear e do coeficiente de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ e os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($M \pm EPM$). A análise estatística foi realizada pelo programa PRISMA (GraphPad Prism 5).

IV RESULTADOS

IV.1 Efeito da dieta e do exercício físico sobre os parâmetros avaliados

IV.1.1 Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o ganho de peso e consumo alimentar

Conforme descrito anteriormente, a dieta hiperglicídica foi implantada logo após o desmame e os animais submetidos ao treinamento físico em esteira passaram por uma semana de adaptação ao mesmo, totalizando, portanto, 5 ou 9 semanas de dieta e 4 ou 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Os resultados das médias de peso inicial, peso final e ganho de peso para os animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira estão demonstrados pelas Tabelas 07 e 08, respectivamente, e Figura 09.

A Tabela 07 e a Figura 09 mostram que não houve diferença entre os pesos iniciais e finais, bem como para o ganho de peso dos grupos experimentais submetidos a 4 semanas de treinamento em esteira.

Tabela 07: Ganho de peso dos grupos submetidos a 4 semanas de treinamento em esteira.

Grupo (n=12)	4 semanas					
	Peso inicial (g)		Peso final (g)		Ganho de peso (g)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	102,2±2,2		287,8±9,4		151,8±8,5	
DS	100,3±3,4	p>0,05	304,9±12,1	p>0,05	164,5±10,9	p>0,05
CTE	102±2,7	p>0,05	260,4±11,82	p>0,05	132,5±10,8	p>0,05
DTE	98,1±3,7	p>0,05	287,2±11,7	p>0,05	164,7±8,05	p>0,05

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

De modo similar ao observado no grupo submetido a 4 semanas de treinamento, no grupo treinado em esteira por 8 semanas não apresentou diferenças entre os pesos iniciais e finais nem para o ganho de peso (Tabela 08 e Figura 09).

O peso final e o ganho de peso para os animais submetidos há 8 semanas treinamento em esteira foram maiores para todos os grupos, quando comparado aos animais de treinados por 4 semanas (Tabela 08 e Figura 09).

Tabela 08: Ganho de peso dos grupos submetidos a 8 semanas de treinamento em esteira.

Grupo (n=6)	8 semanas					
	Peso inicial (g)		Peso final (g)		Ganho de peso (g)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	96,2±6		387,3±11,1		291,2±15,8 ^a	p<0,001 ^a
DS	99,1±6,7	p>0,05	404,3±32,3	p>0,05	305,2±32,5 ^b	p<0,001 ^b
CTE	90,6±6,9	p>0,05	363,8±16,8	p>0,05	273,2±20,7 ^c	p<0,001 ^c
DTE	88,8±5,6	p>0,05	412,4±6,8	p>0,05	323,6±8,7 ^d	p<0,001 ^d

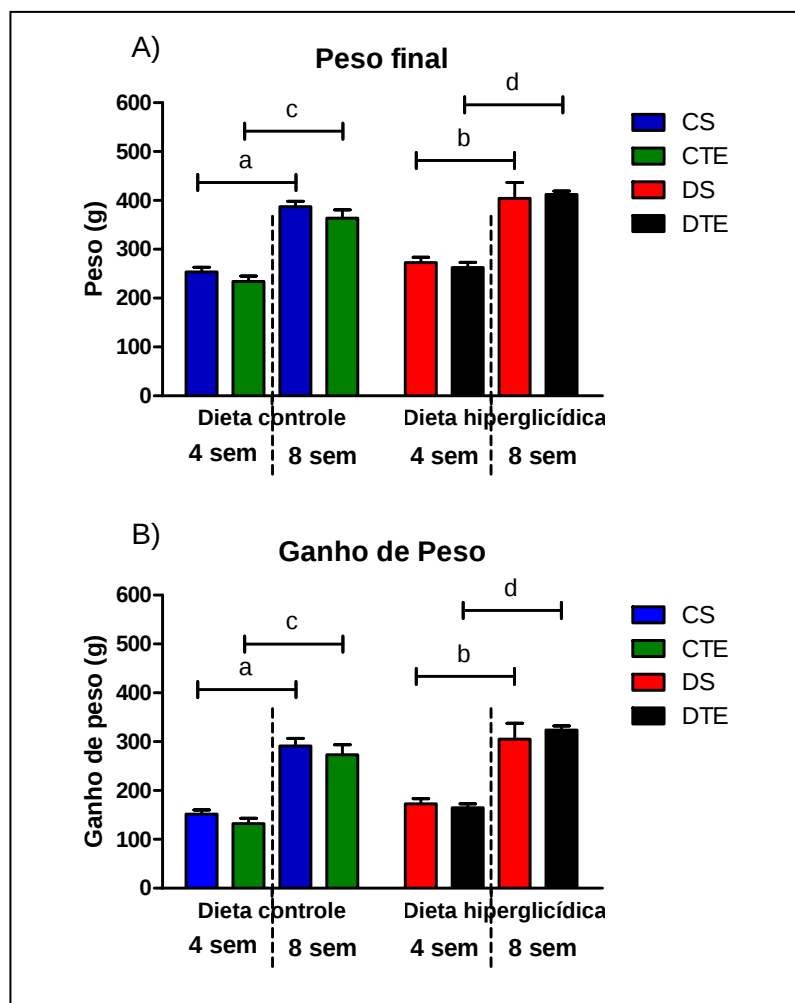
Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

^ap<0,05 em relação ao grupo CS 4 semanas.

^bp<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE 4 semanas.

^dp<0,05 em relação ao grupo DTE 4 semanas.



^ap<0,05 em relação ao grupo CS 4 semanas.

^bp<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE 4 semanas.

^dp<0,05 em relação ao grupo DTE 4 semanas.

Figura 09: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre o peso final (A) e o ganho de peso (B) dos animais após 4 e 8 semanas. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 ou 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 ou 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando p<0,05.

O consumo alimentar e a ingestão calórica dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira não apresentaram diferenças, como demonstrado pela Tabela 09 e ilustrado pela Figura 10. A ingestão calórica foi estimada a partir da multiplicação do consumo alimentar dos grupos que receberam

dieta controle por 2,92 e dos grupos que receberam dieta hiperglicídica por 3,18 (valores que representam quantidade de calorias fornecida por grama de ração/dieta, respectivamente).

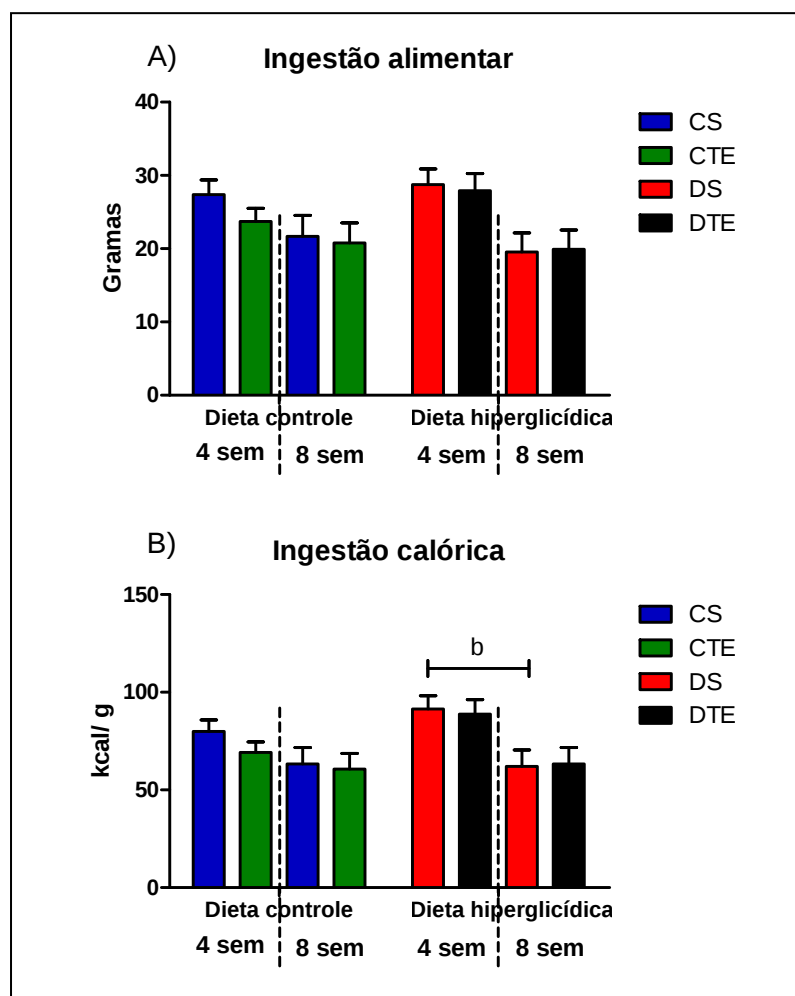
A ingestão alimentar e calórica foram menores para o grupo DS submetido a 8 semanas de treinamento em esteira em relação ao grupo de 4 semanas (Figura 09B).

Tabela 09: Consumo alimentar (g) e ingestão calórica (kcal) dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=5)				8 semanas (n=9)			
	Consumo alimentar (g)		Ingestão calórica (kcal)		Consumo alimentar (g)		Ingestão calórica (kcal)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	27,4±2		80±5,9		21,7±2,9		63,3±8,4	
DS	28,7±2,1	0,6575	91,4±6,8	0,2388	19,5±2,6 ^b	0,5880; 0,0348 ^b	62,1±8,3 ^b	0,9216; 0,0348 ^b
CTE	23,7±1,8	0,2111	69,23±5,3	0,2111	20,8±2,7	0,8246	60,7±8	0,8246
DTE	27,9±2,3	0,1952	88,75±7,5	0,0658	19,9±2,7	0,8191	63,3±8,4	0,8258

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

^bp<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.



^bp<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.

Figura 10: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre a ingestão alimentar (A) e calórica (B) dos animais após 4 e 8 semanas. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 ou 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 ou 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles. O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

IV.1.1.1 Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre os depósitos adiposos retroperitoneal e inguinal

Após 4 ou 8 semanas de treinamento físico em esteira, os animais foram sacrificados e os depósitos retroperitoneal e inguinal, dissecados e pesados. O efeito da dieta e do treinamento sobre estes depósitos é mostrado na Tabela 10 e ilustrado pela Figura 11.

Tabela 10: TA retroperitoneal e inguinal dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=12)				8 semanas (n=6)			
	Retroperitoneal (g)		Inguinal (g)		Retroperitoneal (g)		Inguinal (g)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	1,6±0,19		3,7±0,33		3,8±0,8 ^a	p<0,05 ^a	1,5±0,28 ^a	p<0,05 ^a
DS	2,5±0,35	p>0,05	4,5±0,5	p>0,05	6,7±1,2 ^b	p<0,01 ^b	4,2±0,93*	p<0,01*
CTE	1,6±0,59	p>0,05	2,9±0,54*	p<0,05*	2,3±0,28	p>0,05	0,72±0,22 ^c	p<0,05 ^c
DTE	3,2±0,59	p>0,05	5,1±0,66 [#]	p<0,001 [#]	6,1±0,72 ^{#,d}	p<0,001 ^{#,d}	3,9±1,1 ^{#,d}	p<0,05 ^{#,d}

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

*p<0,05 em relação ao grupo CS.

[#]p<0,05 em relação ao grupo CTE.

^ap<0,05 em relação ao grupo CS 4 semanas.

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE 4 semanas.

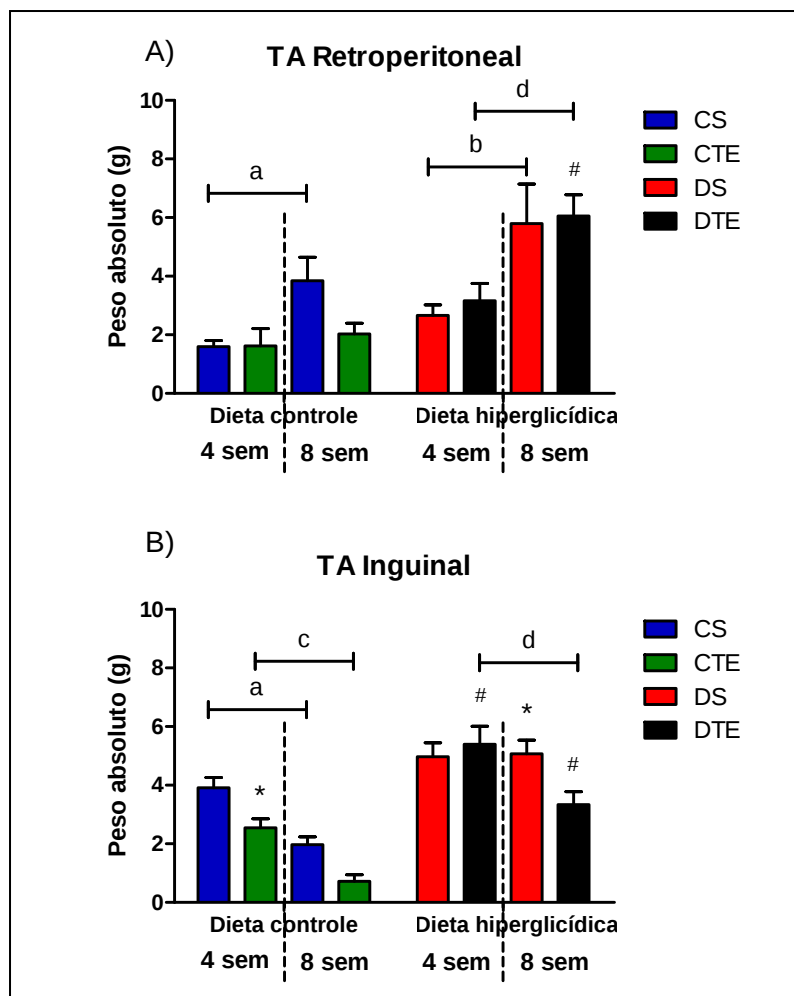
^dp<0,05 em relação ao grupo DTE 4 semanas.

A Figura 11A mostra as alterações sofridas pelo TA retroperitoneal para os animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira. Não foram apresentadas alterações significativas para este depósito no grupo treinado por 4 semanas, enquanto a associação dieta e treinamento resultou numa elevação de 165% no tecido dos animais DTE após 8 semanas. Comparando o coxim retroperitoneal dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira, houve um aumento deste depósito para os grupos CS (137%), DS (168%) e DTE (90%), efeito bloqueado pelo treinamento apenas no grupo que recebeu dieta padrão balanceada.

Como mostrado pela Figura 11B, o tamanho do TA inguinal dos animais submetidos a 4 semanas de treinamento físico em esteira foi afetado diretamente pelo treinamento, mostrando uma redução de 20% do depósito no grupo CTE; entretanto, a associação dieta e treinamento resultou num aumento de 75% no

tecido do grupo DTE. Para o grupo treinado em esteira por 8 semanas, a dieta afetou diretamente o resultado, aumentando em 180% o tamanho do TA inguinal do grupo DS, enquanto a associação entre as duas variáveis resultou numa elevação de 210% do depósito no grupo DTE.

A comparação entre o TA inguinal dos grupos submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira apresentou uma redução do coxim influenciada pela dieta e pelo treinamento, como demonstrado pelos grupos CS (60%), CTE (75%) e DTE (20%); entretanto, este efeito não foi observado para o grupo dieta hiperglicídica-sedentário (DS).



* $p < 0,05$ em relação ao grupo CS.

$p < 0,05$ em relação ao grupo CTE.

^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CS 4 semanas.

^c $p < 0,05$ em relação ao grupo CTE 4 semanas.

^d $p < 0,05$ em relação ao grupo DTE 4 semanas.

Figura 11: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico sobre os depósitos retroperitoneal (A) e inguinal (B). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 ou 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 ou 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

IV.1.1.2 Efeito da dieta e do treinamento físico sobre o TAM

Conforme citado anteriormente, após 4 ou 8 semanas de treinamento em esteira, os animais foram sacrificados e o TAM dissecado e pesado. O efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre o TAM está demonstrado na Tabela 11 e ilustrado pela Figura 12.

Tabela 11: TAM de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

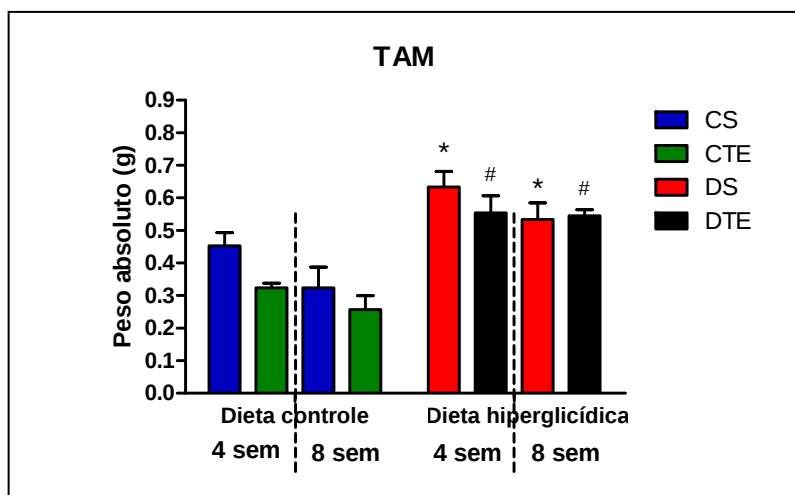
Grupo	4 semanas (n=12)		8 semanas (n=6)	
	TAM		TAM	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	0,44±0,04		0,32±0,06	
DS	0,61±0,05*	p<0,01*	0,53±0,05*	p<0,05*
CTE	0,32±0,01	p>0,05	0,26±0,04	p>0,05
DTE	0,55±0,05 [#]	p<0,001 [#]	0,55±0,02 [#]	p<0,01 [#]

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

*p<0,05 em relação ao grupo CS.

[#]p<0,05 em relação ao grupo CTE.

A Figura 12 mostra as alterações sofridas pelo TAM dos animais submetido a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira. Os animais submetidos a 5 semanas de dieta tiveram um aumento de 38% no TAM e o treinamento por 4 semanas não bloqueou o efeito da dieta, aumentando o TAM do DTE em 71%. Para os animais submetidos a 9 semanas de dieta, o TAM sofreu um acréscimo de 65%, o qual, de forma análoga ao treinamento por 4 semanas, não teve o efeito da dieta bloqueado pelo treinamento por 8 semanas, aumentando em 111% para o DTE. Não houve diferenças no peso deste depósito entre os dois períodos de treinamento.



* $p < 0,05$ em relação ao grupo CS.

$p < 0,05$ em relação ao grupo CTE

Figura 12: Efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre o TAM. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 ou 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 ou 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

IV.1.1.3 Avaliação do grau de obesidade: índices de Lee e de adiposidade

No dia do sacrifício, os animais foram pesados e o comprimento naso-anal (CNA) aferido para o cálculo do índice de Lee. Após a dissecação, os depósitos adiposos foram pesados e o índice de adiposidade foi calculado, conforme descrito em *Metodologia*. O efeito da dieta e do treinamento em esteira sobre os índices de Lee e adiposidade é mostrado na Tabela 12 e ilustrado pela Figuras 13.

Tabela 12: Índices de Lee e de adiposidade dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=12)				8 semanas (n=6)			
	Índice de Lee		IA		Índice de Lee		IA	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	0,32±0,005		2±0,2		0,33±0,003		2,7±0,3	
DS	0,32±0,005	p>0,05	3,7±0,28	p>0,05	0,34±0,003 ^b	p<0,05 ^b	3,9±0,63	p>0,05
CTE	0,32±0,004	p>0,05	2,8±0,67	p>0,05	0,32±0,005	p>0,05	1,8±0,23	p<0,05
DTE	0,32±0,005	p>0,05	4,4±0,57 [#]	p<0,05 [#]	0,33±0,005	p>0,05	4,2±0,46 [#]	p<0,05 [#]

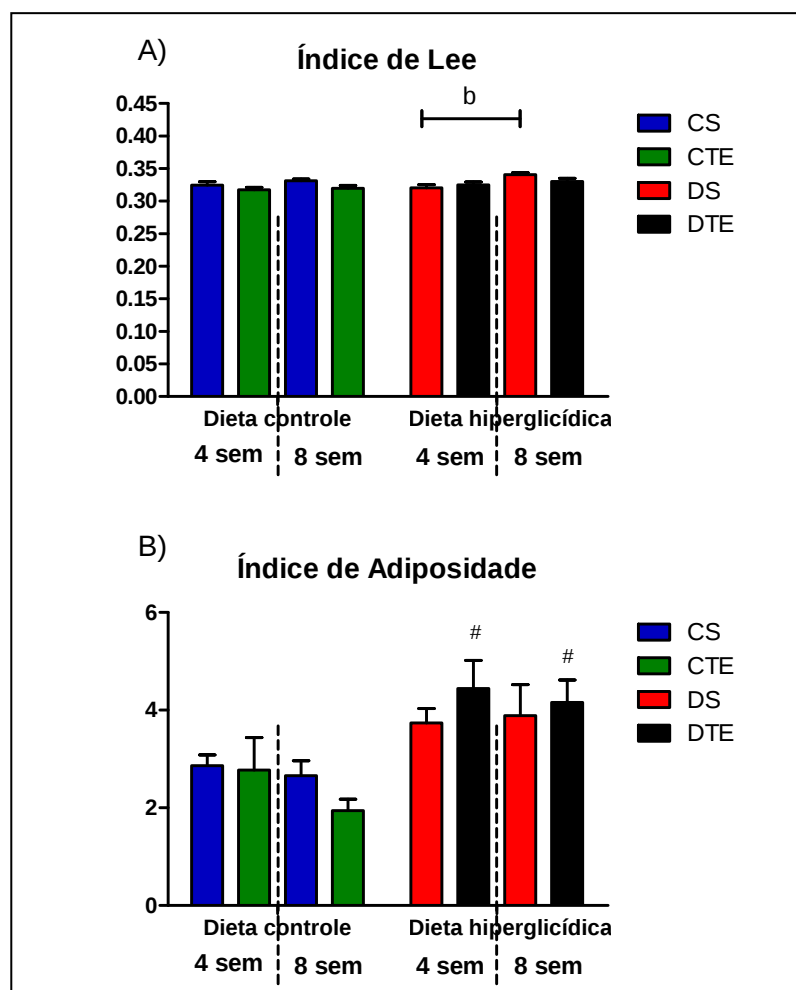
Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

[#] p<0,05 em relação ao grupo CTE.

^b p<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.

A Figura 13A mostra que não houve diferenças entre o índice de Lee dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira. Entretanto, a comparação entre os dois períodos de treinamento mostrou um aumento de 6% no índice do grupo DS.

Como demonstrado pela Figura 13B, a associação entre dieta e treinamento exerceu efeito sobre o índice de adiposidade dos grupos DTE por 4 e 8 semanas, aumentando em 57% e 133% os valores do índice, respectivamente.



[#]p<0,05 em relação ao grupo CTE.

^bp<0,05 em relação ao grupo DS 4 semanas.

Figura 13: Grau de obesidade determinado pelos índices de Lee (A) e de adiposidade (B) dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 ou 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 ou 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento ([#]) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando p<0,05.

Contudo, para verificar se o ganho de peso era acompanhado pelo aumento da adiposidade, foi realizada pela correlação linear (coeficiente de Pearson) entre as duas variáveis.

A Tabela 13 representa a correlação entre as variáveis ganho de peso e índice de adiposidade dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Tabela 13: Correlação entre ganho de peso e índice de adiposidade dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=12)			8 semanas (n=6)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	0,1661	0,0276	0,6254	0,1998	0,0399	0,7044
DS	0,9099*	0,8280*	0,0001*	0,8863*	0,7856*	0,0186*
CTE	0,2571	0,0661	0,4455	0,7591	0,5762	0,1367
DTE	0,8907*	0,7933*	0,0002*	0,0772	0,0060	0,8845

*p<0,05.

As Figuras 14A e 14B mostram que houve correlação positiva significativa entre o ganho de peso e o índice de adiposidade para os grupos DS e DTE do grupo submetido a 5 semanas de dieta, acompanhadas de valores significativos no coeficiente de determinação (R²).

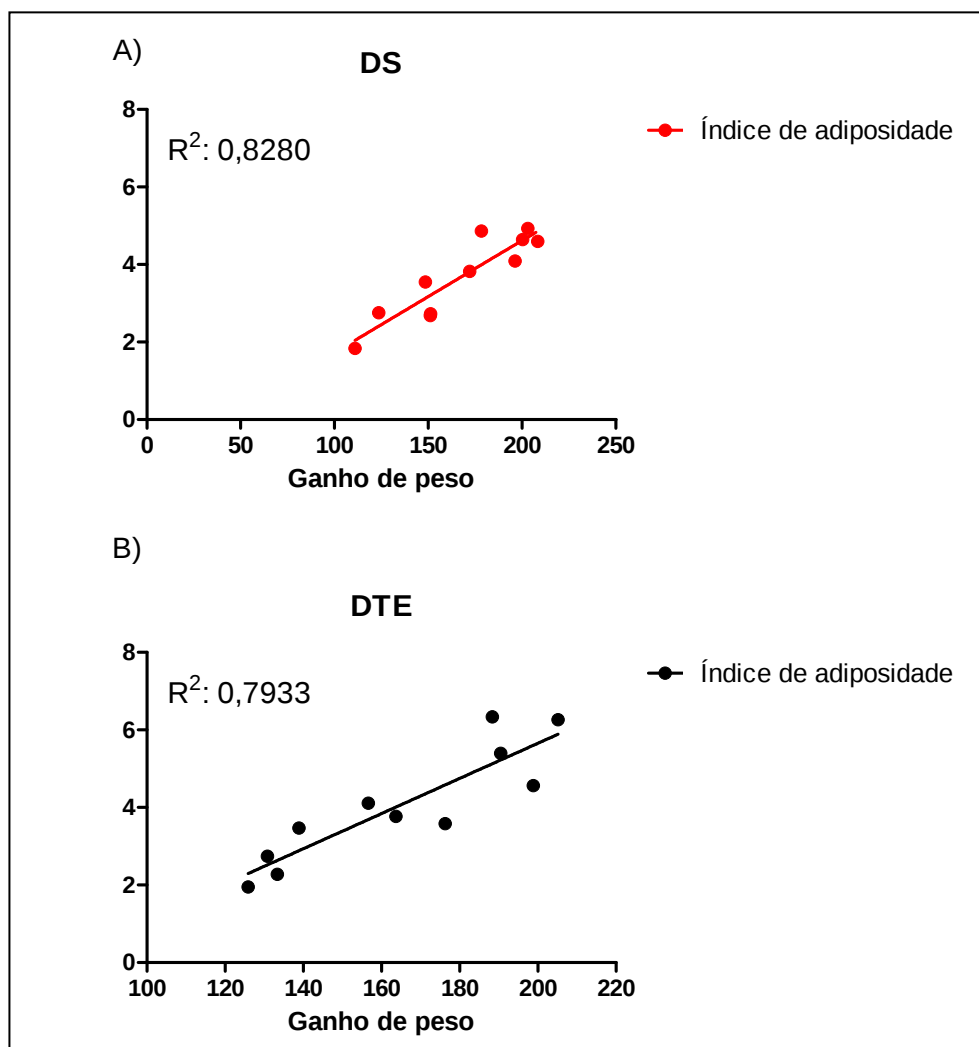


Figura 14: Relação entre ganho de peso e índice de adiposidade (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas. Grupos DS (A) e DTE (B). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 semanas.

Para o grupo submetido a 9 semanas de dieta, houve correlação positiva significativa entre o ganho de peso e o índice de adiposidade somente para o grupo DS (Figura 15).

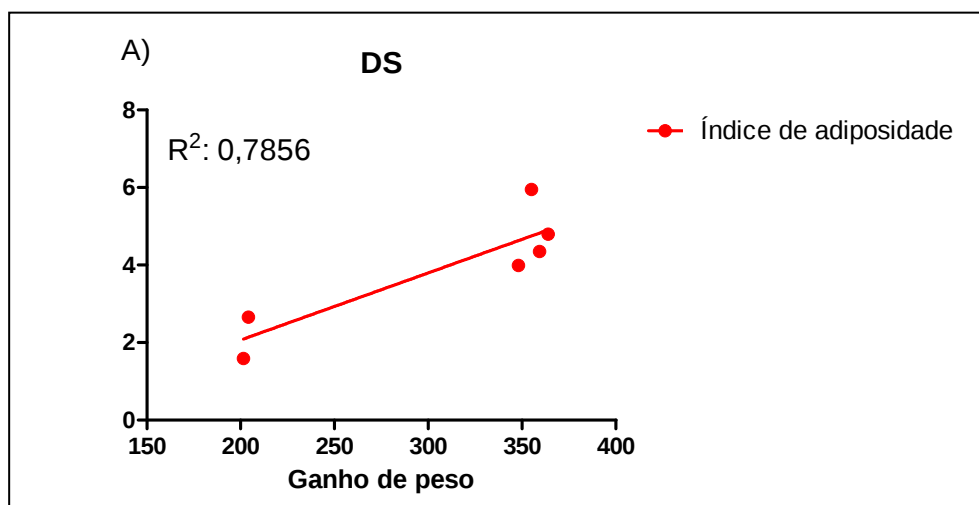


Figura 15: Relação entre ganho de peso (g) e índice de adiposidade (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupo DS (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.1.1.4 Comparação do desempenho físico dos animais

Após 4 dias de adaptação, os animais foram submetidos ao teste do esforço físico (exercício progressivo) em esteira com inclinação fixa até o ponto de fadiga, para determinação da capacidade de realização de trabalho e demonstrar que não havia diferenças entre os mesmos. No penúltimo dia (4º dia) da 4ª e 8ª semanas foram novamente submetidos ao exercício progressivo e o desempenho físico dos animais treinados foi comparado à semana de adaptação, como demonstrado pela Tabela 14 e ilustrado pela Figura 16.

Tabela 14: Capacidade de realização de trabalho de animais submetidos 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

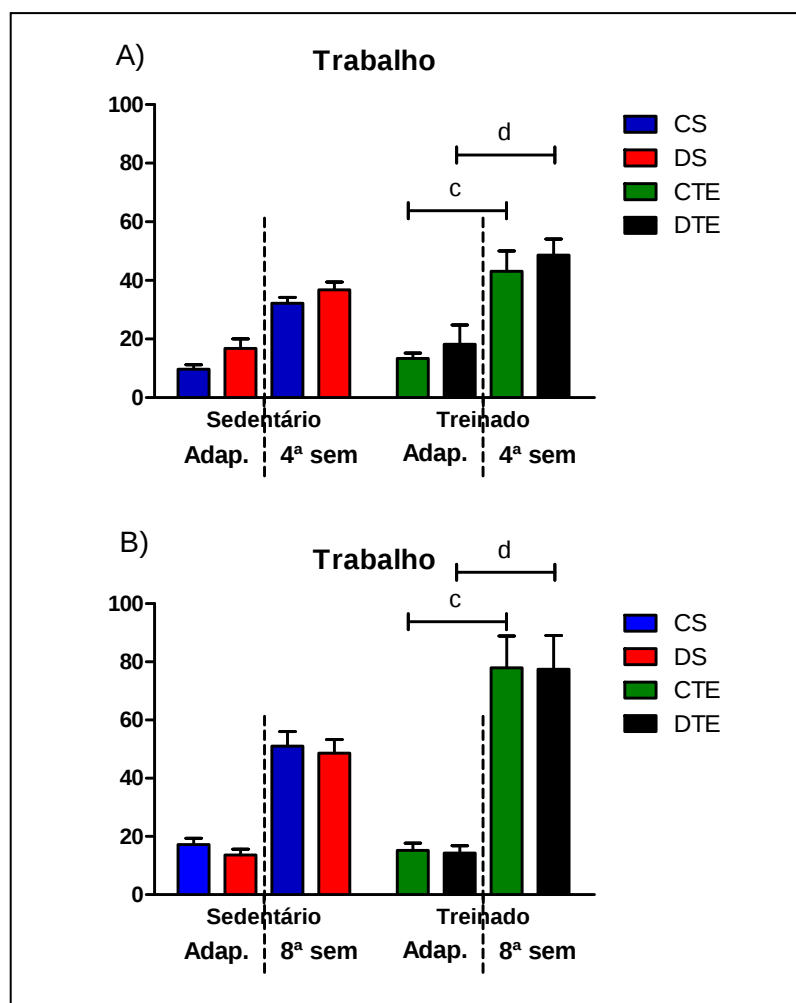
Grupo	Adaptação (n=12)		4ª semana (n=12)		Adaptação (n=6)		8ª semana (n=6)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	1,6±1,3		32,2±2		17,2±2,2		51±5	
DS	18,3±3,1	p>0,05	36,8±2,6	p>0,05	13,6±2	p>0,05	48,6±4,7	p>0,05
CTE	14,6±1,5	p>0,05	47±6,3 ^c	p<0,001 ^c	15,2±2,5	p>0,05	77,9±11 ^c	p>0,001 ^c
DTE	19,8±7	p>0,05	53,1±3,5 ^d	p<0,001 ^d	14,3±2,2	p>0,05	77,5±11,5 ^d	p>0,001 ^d

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE na semana de adaptação.

^dp<0,05 em relação ao grupo DTE na semana de adaptação.

Conforme ilustrado pela Figura 16A, a capacidade de realização de trabalho dos grupos CTE e DTE por 4 semanas de treinamento em esteira aumentou 221% e 168%, respectivamente, enquanto para os grupos CTE e DTE por 8 semanas aumentou em 410% e 440%, respectivamente (Figura 16B).



^cp<0,05 em relação ao grupo CTE na semana de adaptação.

^dp<0,05 em relação ao grupo DTE na semana de adaptação.

Figura 16: Capacidade de realização de trabalho dos animais treinados em esteira por 4 8 semanas. (A) Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 semanas. (B) Os animais DS após o desmame receberam dieta hiperglicídica durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas. A seguir, foram decapitados e os depósitos recolhidos, pesados, armazenados e comparados com os respectivos controles. O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando p<0,05.

IV.1.2 Efeito da dieta e do treinamento físico em esteira sobre os níveis plasmáticos de leptina, insulina e ácidos graxos não esterificados (NEFAs)

IV.1.2.1 Níveis plasmáticos de leptina

Ao final das 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira, os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram colhidas para determinar a concentração circulante do hormônio leptina por radioimunoensaio, conforme descrito em *Metodologia*.

Os níveis de leptina no plasma dos grupos submetido a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira estão demonstrados na Tabela 15 e ilustrados pela Figura 17.

Tabela 15: Níveis plasmáticos de leptina (ng/mL) de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=11)		8 semanas (n=6)	
	Leptina		Leptina	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	4±0,27		3,4±0,63	
DS	5,9±0,47*	p<0,01*	5,7±1,05*	p<0,001*
CTE	2,7±0,21*	p<0,05*	3,9±0,74	0,6034
DTE	4,6±0,39 ^{#§}	p<0,01 [#] ; p<0,05 [§]	6,7±0,89 ^{#,d}	p<0,001 [#] , p<0,001 ^d

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

*p<0,05 em relação ao grupo CS.

[#]p<0,05 em relação ao grupo CTE.

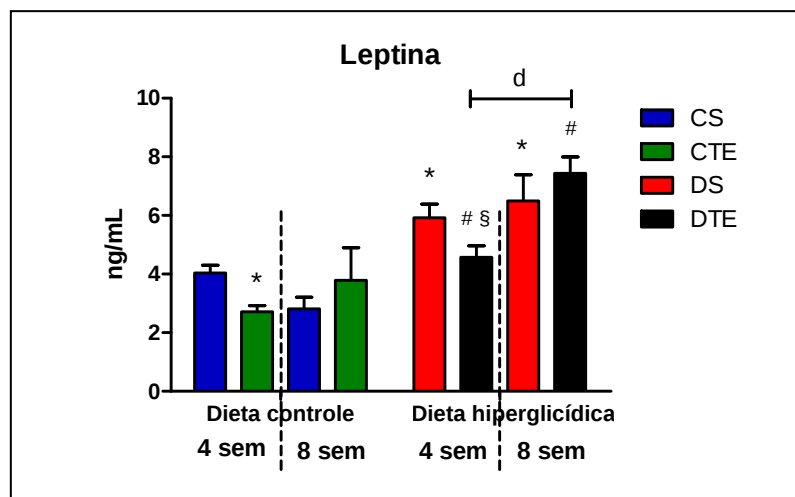
[§]p<0,05 em relação ao grupo DS.

^dp<0,05 em relação ao grupo DTE 4 semanas.

A Figura 17 representa os níveis de leptina plasmática dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. O efeito da dieta sobre os níveis de leptina foi extremamente significativo, como demonstrado pela elevação dos níveis plasmáticos do hormônio nos grupos DS por 4 e 8 semanas (47,5% e 67%, respectivamente). A associação entre dieta e treinamento resultou em acréscimos de 70% da leptina plasmática do grupo DTE por 4 semanas e de 71% do grupo DTE por 8 semanas. O treinamento físico em esteira *per si* afetou de forma significativa a concentração da leptina circulante por 4 semanas, reduzindo os níveis do hormônio em 32% no grupo CTE e 22% no grupo DTE (em relação ao DS).

Todavia, este efeito não foi observado para os animais submetidos ao treinamento físico em esteira por 8 semanas.

A comparação entre os níveis plasmáticos de leptina dos grupos submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira mostrou um aumento de 45% na leptina plasmática do grupo DTE.



* $p < 0,05$ em relação ao grupo CS

$p < 0,05$ em relação ao grupo CTE.

§ $p < 0,05$ em relação ao grupo DS

^d $p < 0,05$ em relação ao grupo DTE 4 semanas.

Figura 17: Níveis plasmáticos de leptina (ng/mL) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 e 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 e 8 semanas. A seguir, foram decapitados e as amostras de sangue foram coletadas, armazenadas e comparadas com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

IV.1.2.2 Níveis plasmáticos de insulina

Ao final das 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira, os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram colhidas para determinar a concentração circulante do hormônio insulina por radioimunoensaio, conforme descrito em *Metodologia*.

Os níveis de insulina no plasma dos grupos submetido a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira estão demonstrados na Tabela 16 e ilustrados pela Figura 18.

Tabela 16: Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas		8 semanas	
	Insulina (n=11)		Insulina (n=6)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	1,2±0,15		1,2±0,09	
DS	2±0,41	p>0,05	1,7±0,28	p>0,05
CTE	0,7±0,06	p>0,05	1,4±0,46 ^c	p<0,01 ^c
DTE	1±0,12 ^s	p<0,001 ^s	1,6±0,2	p>0,05

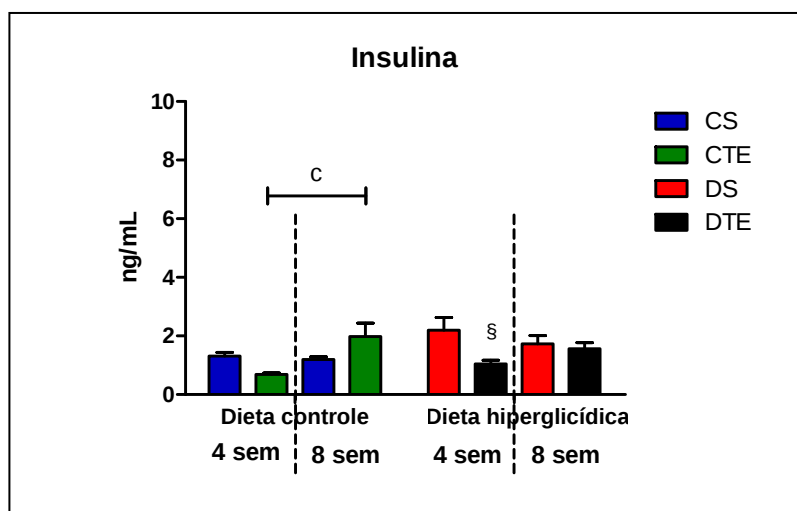
Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (M±EPM).

^sp<0,05 em relação ao grupo DS.

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE 4 semanas.

A Figura 18 mostra os níveis plasmáticos de insulina dos animais submetidos a 4 e 8 semanas treinamento físico em esteira. A associação entre dieta e treinamento resultou numa redução de 100% nos níveis plasmáticos de insulina do grupo DTE por 4 semanas, enquanto não foram observadas alterações significativas nos níveis do hormônio circulante para o grupo treinado em esteira por 8 semanas.

A comparação entre os níveis plasmáticos de insulina dos grupos submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira mostrou um aumento de 100% na insulina plasmática do grupo CTE.



^sp<0,05 em relação ao grupo DS.

^cp<0,05 em relação ao grupo CTE 4 semanas.

Figura 18: Níveis plasmáticos de insulina (ng/mL) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 e 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 e 8 semanas. A seguir, foram decapitados e as amostras de sangue foram coletadas, armazenadas e comparadas com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando p<0,05.

Para avaliar a existência de uma relação entre níveis de insulina e leptina plasmáticos, foi realizada uma correlação linear (coeficiente de Pearson) entre estas duas variáveis dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira, como representado pela Tabela 17.

Tabela 17: Correlação entre níveis plasmáticos de insulina e leptina dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=12)			8 semanas (n=6)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	0,1975	0,0383	0,6741	0,4804	0,2307	0,4128
DS	-0,1029	0,0106	0,8262	0,5582	0,3116	0,3282
CTE	0,5461	0,2982	0,1024	0,7448	0,5547	0,2553
DTE	-0,4230	0,1789	0,1707	0,6653	0,4426	0,3347

*p<0,05.

Não houve correlações significativas entre as duas variáveis analisadas em todos os grupos.

V.1.2.3 Níveis plasmáticos de NEFAs

Ao final das 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira, os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram colhidas para determinar a concentração circulante de NEFAs pelo método colorimétrico, conforme descrito em *Metodologia*.

Os níveis de NEFAs no plasma dos grupos submetido a 4 e 8 semanas de treinamento em esteira estão demonstrados na Tabela 18 e ilustrado pela Figura 19.

Tabela 18: Níveis plasmáticos de NEFAs de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas		8 semanas	
	NEFAs (n=11)		NEFAs (n=6)	
	M ± EPM	p-valor	M ± EPM	p-valor
CS	0,8±0,07		0,9±0,22	
DS	1,1±0,12	p>0,05	1±0,13	p>0,05
CTE	1,1±0,15	p>0,05	0,9±0,16	p>0,05
DTE	1±0,13	p>0,05	0,8±0,1	p>0,05

Os dados estão representados como média ± erro padrão da media (M±EPM).

De acordo com a Figura 19, a dieta e o treinamento físico em esteira não afetaram os níveis de NEFAs circulantes dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento, bem como a comparação entre os dois períodos também não apresentou diferenças.

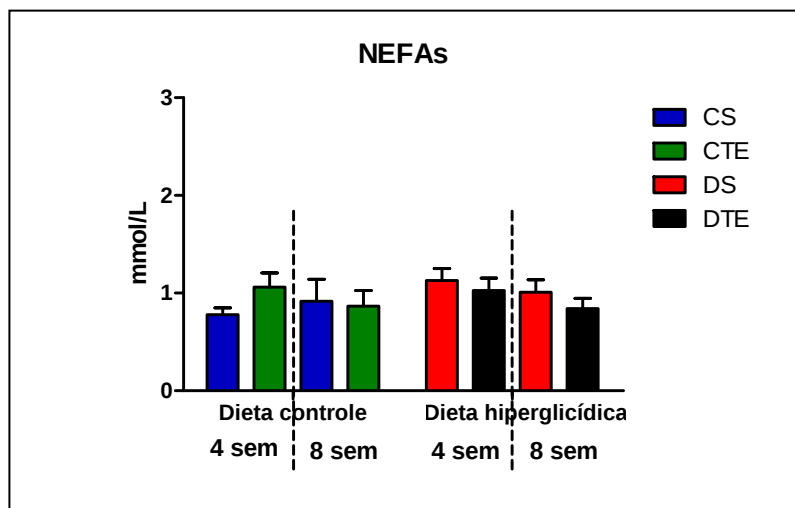


Figura 19: Níveis plasmáticos de NEFAs (mmol/L) após 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 e 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 e 8 semanas. A seguir, foram decapitados e as amostras de sangue foram coletadas, armazenadas e comparadas com os respectivos controles.

O efeito da dieta (*) e/ou do treinamento (#) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

Para verificar a existência de uma relação entre os níveis plasmáticos de leptina e NEFAs foi realizada uma correlação linear entre estas duas variáveis.

A Tabela 19 mostra a correlação linear (coeficiente de Pearson) entre os níveis plasmáticos de leptina e NEFAs dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Tabela 19: Correlação entre níveis plasmáticos de leptina e NEFAs dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=12)			8 semanas (n=6)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	0,0320	0,0010	0,9255	-0,4312	0,1859	0,5688
DS	-0,1620	0,0263	0,6341	0,7412	0,5494	0,2588
CTE	0,5339	0,2850	0,0907	0,5873	0,3449	0,4127
DTE	-0,0635	0,0040	0,8447	-0,9592*	0,9202*	0,0408*

* $p < 0,05$.

A Figura 20 mostra a existência de uma correlação linear negativa significativa entre os níveis plasmáticos de leptina e NEFAs para o grupo DTE por 8 semanas.

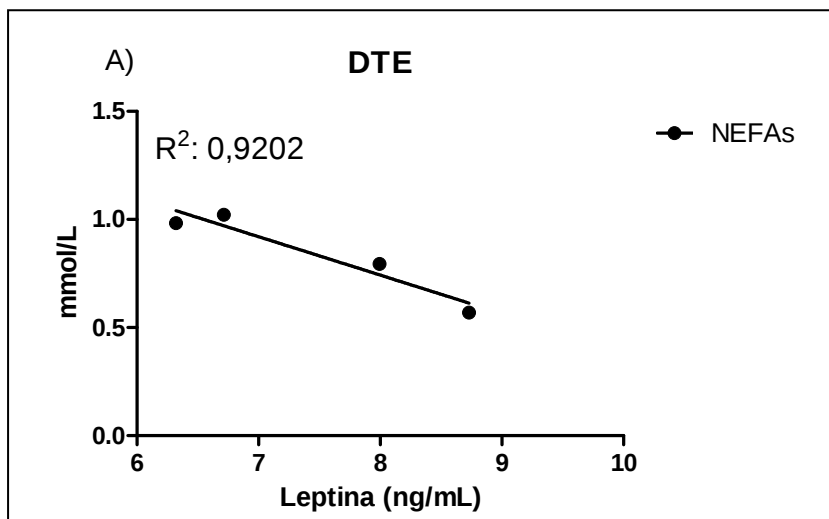


Figura 20: Relação entre níveis plasmáticos de leptina (ng/ mL) e NEFAs (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupo DTE (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.2 Expressão gênica relativa dos transcritos avaliados

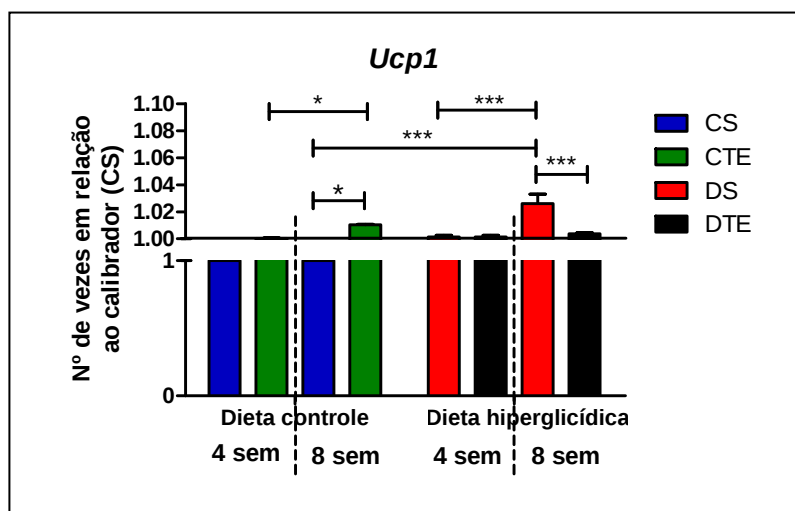
IV.2.1 Quantificação dos níveis de mRNA de *Ucp1* no TAM

A análise da expressão do gene *Ucp1* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

A Figura 21 mostra o padrão de expressão gênica para *Ucp1* no TAM de animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas.

Para os animais submetidos ao treinamento físico em esteira por 4 semanas, não houve diferenças no padrão de expressão do gene *Ucp1* entre as diferentes amostras (Figura 21). Entretanto, o padrão de expressão do gene *Ucp1* após 8 semanas foi afetado diretamente pela dieta, aumentando sua expressão 2,6 vezes no grupo DS. O treinamento em esteira por 8 semanas aumentou 1 vez a expressão

do gene no grupo CTE, ao passo que a associação entre dieta e treinamento reduziu em 2,2 vezes os níveis do transcrito no grupo DTE. A comparação da expressão gênica do *Ucp1* entre os dois períodos de treinamento mostrou um aumento de 2,5 vezes em sua expressão no grupo DS e um aumento de 1 vez no grupo CTE por 8 semanas de treinamento físico em esteira.



*p<0,05.

**p<0,01.

***p<0,001.

Figura 21: Expressão relativa do gene *Ucp1* no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS). O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando p<0,05.

Com a finalidade de verificar se o aumento no TAM decorrente da dieta era acompanhado pela elevação dos níveis de mRNA de *Ucp1* no tecido, realizamos uma correlação linear entre estas variáveis.

A Tabela 20 representa a correlação entre o peso do TAM e o número de moléculas de mRNA de *Ucp1*.

Tabela 20: Correlação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de *Ucp1* dos animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=3)			8 semanas (n=3)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	-0,0837	0,0070	0,8305	-0,0241	0,0006	0,9509
DS	0,9282*	0,8616*	0,0003*	-0,8286*	0,6865*	0,0058*
CTE	-0,5268	0,2775	0,1451	0,8162*	0,6661*	0,0058
DTE	-0,4314	0,1861	0,2463	-0,7899*	0,6239*	0,0113*

*p<0,05.

Como ilustrado pela Figura 22, para os animais submetidos a 4 semanas de treinamento físico em esteira, o aumento do TAM dos animais DS foi acompanhado de uma elevação nos níveis de mRNA do gene *Ucp1*, devido à existência de uma correlação positiva significativa entre as duas variáveis.

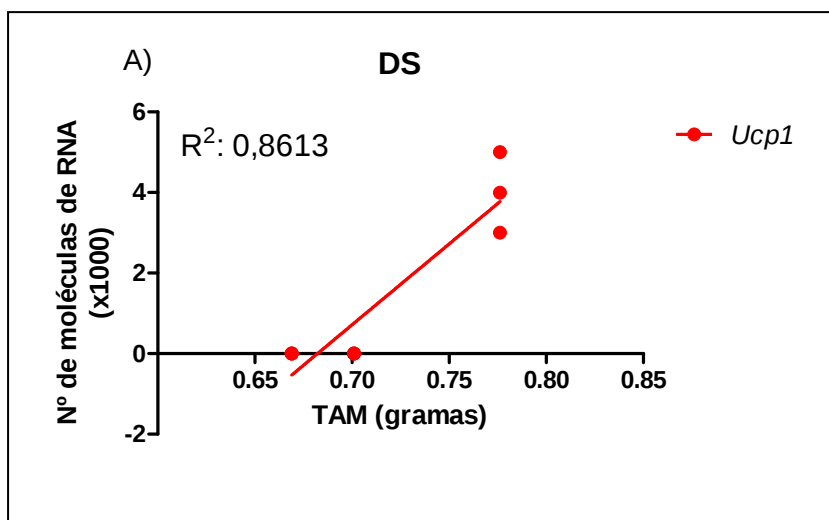


Figura 22: Relação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de *Ucp1* (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas. Grupo DS (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 semanas.

A Figura 23 mostra que, o aumento do TAM decorrente da dieta nos animais treinados por 8 semanas em esteira foi acompanhado de uma redução nos níveis de mRNA do gene *Ucp1* nos grupos DS e DTE, efeito ilustrado pela existência de uma correlação negativa significativa entre as variáveis nestes grupos (Figuras 23^a e C,

respectivamente). Entretanto, o treinamento *per si* provocou um aumento do tecido acompanhado de um aumento na transcrição do gene no grupo CTE, devido à existência de uma correlação positiva significativa entre as duas variáveis (Figura 23B).

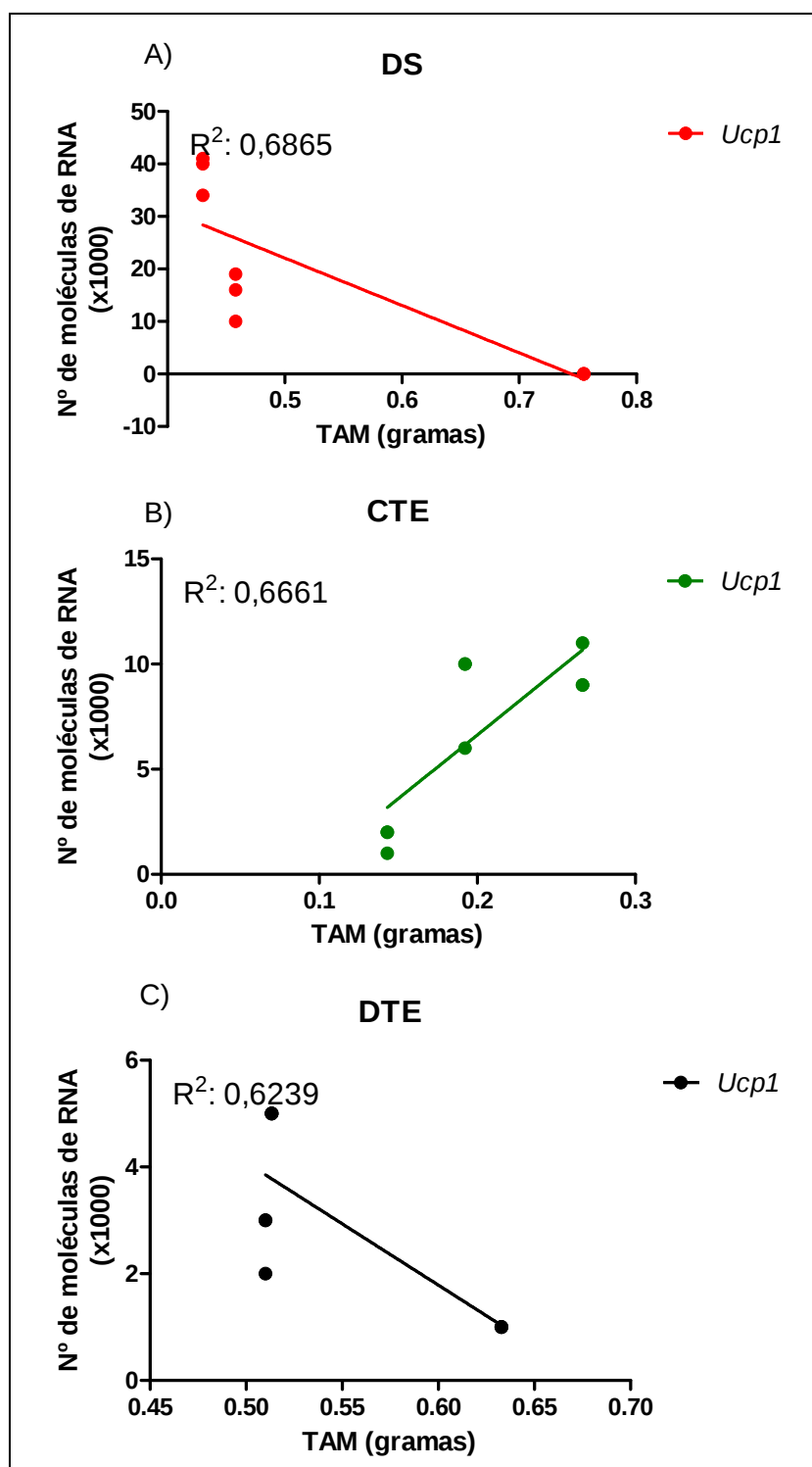


Figura 23: Relação entre peso do TAM (gramas) e número de moléculas de mRNA de *Ucp1* (mmol/ L) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupos DS (A), CTE (B) e DTE (C). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.2.2 Quantificação dos níveis de mRNA de *Adra2a* e *Adrb3* no TAM

A análise da expressão dos genes *Adra2a* e *Adrb3* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

O padrão de expressão dos genes *Adra2a* e *Adrb3* no TAM de animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas é mostrado pelas Figuras 24 e 25.

De acordo com a Figura 24, os níveis de expressão do gene *Adra2a* nos animais treinados em esteira por 4 semanas foram iguais ao do calibrador (CS), enquanto não houve diferenças no padrão de expressão do gene entre as diferentes amostras dos animais submetidos ao treinamento por 8 semanas. A comparação da expressão do gene *Adra2* entre os dois períodos de treinamento não mostrou diferenças.

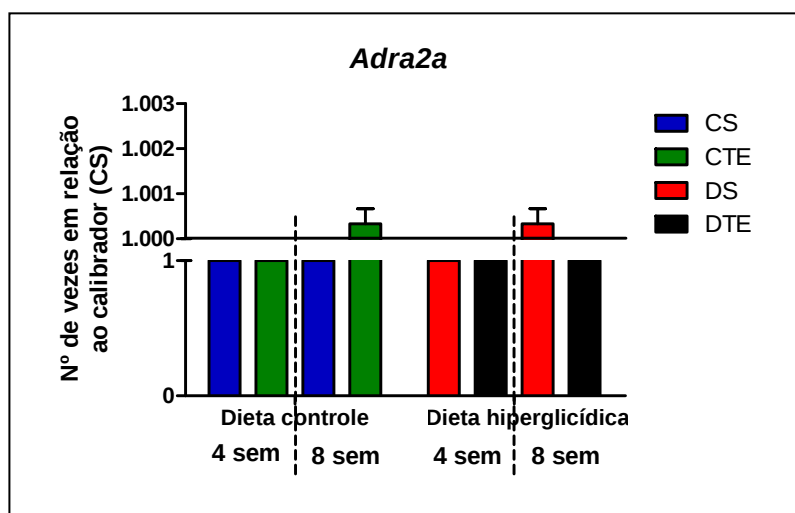
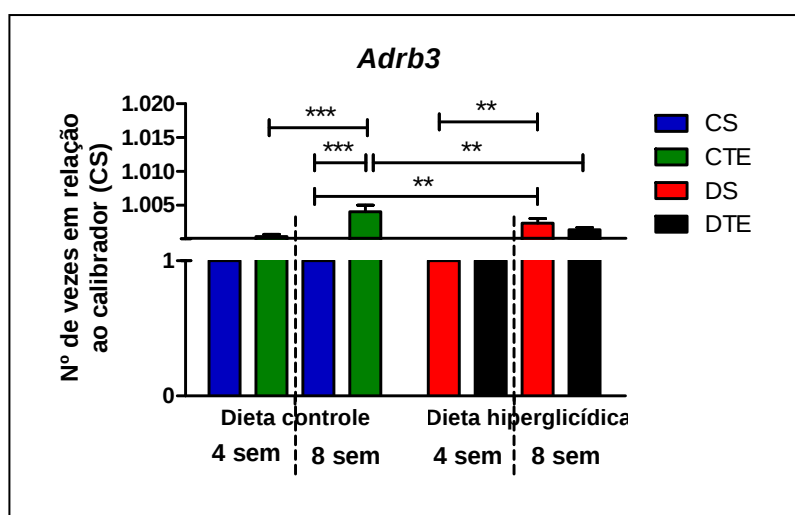


Figura 24: Expressão relativa do gene *Adra2a* no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS). O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

A Figura 25 mostra que o padrão de expressão do gene *Adrb3* no TAM de animais treinados em esteira por 4 semanas não apresentou diferenças entre as amostras. Para os animais submetidos ao treinamento físico em esteira por 8

semanas, a dieta aumentou a expressão do gene em 0,2 vezes no grupo DS e o treinamento aumentou em 0,4 vezes para CTE, ao passo que a associação entre dieta e treinamento reduziu os níveis de expressão do *Adrb3* no DTE 0,3 vezes.

A comparação da expressão do gene *Adrb3* entre os dois períodos de treinamento foi 0,2 vezes maior para o grupo DS e 0,4 vezes maior para o grupo CTE por 8 semanas



*p<0,05.

**p<0,01.

***p<0,001.

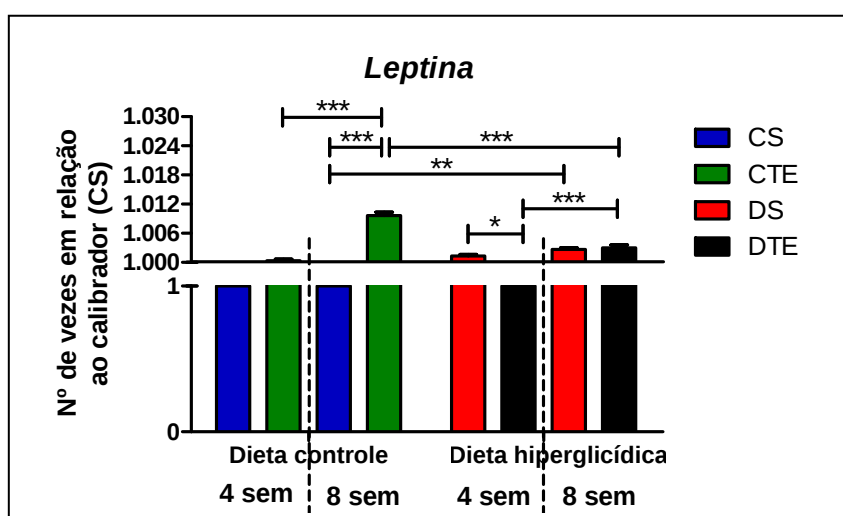
Figura 25: Expressão relativa do gene *Adrb3* no TAM de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS). O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p<0,05$.

IV.2.3 Quantificação dos níveis de mRNA de *Leptina* e seu receptor no TA retroperitoneal

A análise da expressão do gene *Leptina* e seu receptor (*rLep*) foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

Como representado pela Figura 26, o padrão de expressão gênica para *Leptina* dos animais submetidos ao treinamento físico em esteira por 4 semanas não

apresentou diferenças, sendo expresso no grupo DTE igualmente ao calibrador (CS) e, 0,1 vez inferior ao DS. Para os animais treinados por 8 semanas, os níveis de expressão do gene aumentou 0,3 vezes no grupo DS e 1 vez no grupo CTE em relação ao calibrador, enquanto a associação entre dieta e treinamento reduziu em 0,7 vezes os níveis do transcrito no grupo DTE (em relação ao grupo CTE). A comparação da expressão do gene *Leptina* entre os dois períodos de treinamento mostrou um aumento de 1 vez no grupo CTE e 0,3 vezes no grupo DTE por 8 semanas.



*p<0,05.

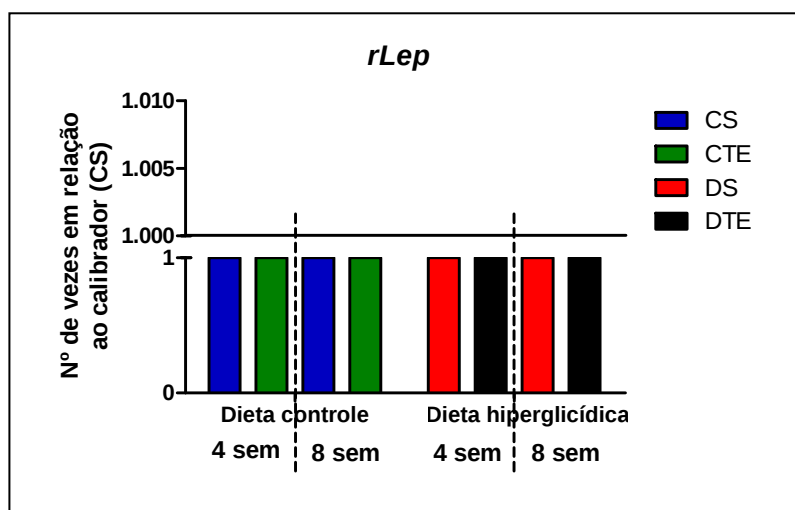
**p<0,01.

***p<0,001.

Figura 26: Expressão relativa do gene *Leptina* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

De acordo com a Figura 27, os níveis de expressão do gene *rLep* nos animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas foram iguais aos níveis detectados para o calibrador (CS).



*p<0,05.

**p<0,01.

***p<0,001.

Figura 27: Expressão relativa do gene *rLep* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p<0,05$.

Para verificar se o aumento nos níveis de mRNA de leptina eram acompanhados pela elevação da proteína plasmática, realizamos uma correlação linear entre estas variáveis.

A Tabela 21 representa a correlação entre o número de moléculas de mRNA de *Leptina* e os níveis plasmáticos da proteína.

Tabela 21: Correlação entre o número de moléculas de mRNA de *Leptina* e leptina plasmática de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=3)			8 semanas (n=3)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	-	-	-	-0,4180	0,1747	0,2629
DS	0,3166	0,1002	0,4065	0,6362	0,4048	0,0655
CTE	0,3402	0,1158	0,3703	0,8092*	0,6548*	0,8092*
DTE	-	-	-	-0,5200	0,2704	0,1513

*p<0,05.

A Figura 26 mostra a existência de uma correlação positiva significativa entre os níveis de mRNA de leptina e os níveis da proteína circulante apenas para o grupo CTE por 8 semanas.

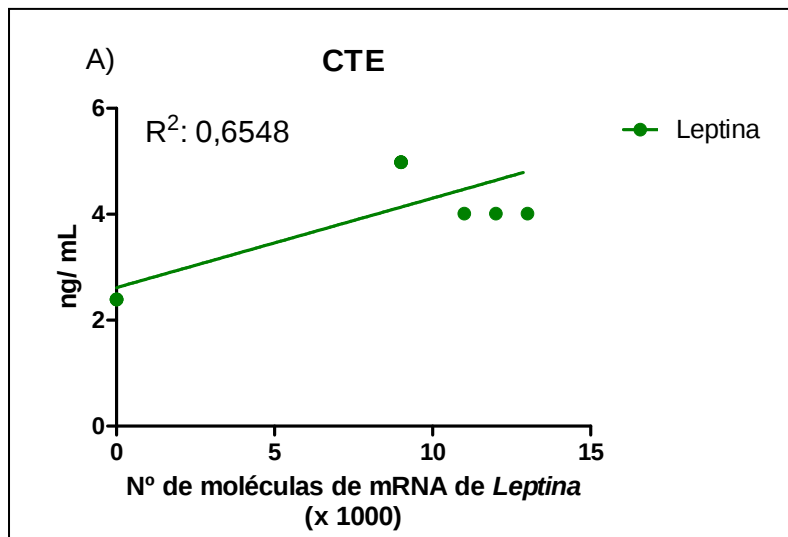


Figura 28: Relação entre número de moléculas de mRNA de *Leptina* e níveis de leptina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupo CTE (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.2.4 Quantificação dos níveis de mRNA do *rlns* no TA retroperitoneal

A análise da expressão do gene *rlns* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

A Figura 28 representa o padrão de expressão gênica do *rlns*, o qual não apresentou diferenças significativas entre as diferentes amostras submetidas ao treinamento em esteira por 4 e 8 semanas. A comparação da expressão do gene *rlns* no TA retroperitoneal entre os dois períodos de treinamento não mostrou diferenças.

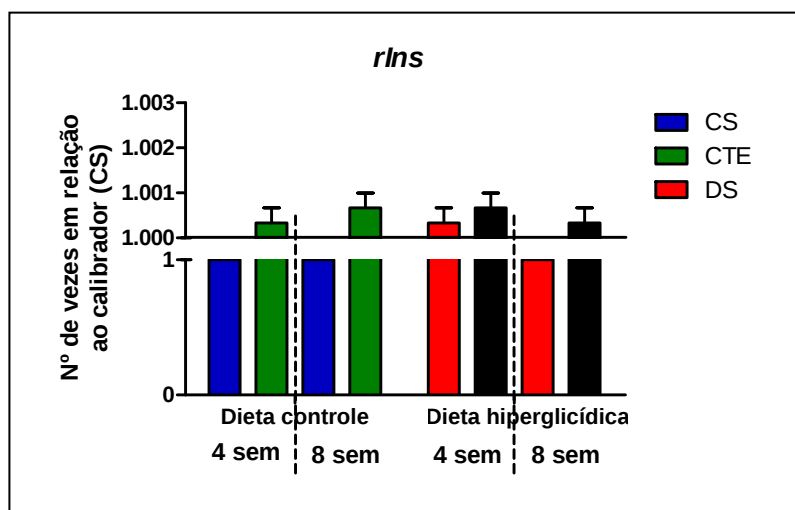


Figura 29: Expressão relativa do gene *rlns* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

A fim de se verificar se o aumento nos níveis de mRNA de *rlns* eram acompanhados pela redução da proteína plasmática, realizamos uma correlação linear entre estas variáveis.

A Tabela 22 representa a correlação entre o número de moléculas de mRNA de *rlns* e os níveis plasmáticos de insulina.

Tabela 22: Correlação entre o número de moléculas de mRNA de *rlns* e insulina plasmática de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=3)			8 semanas (n=3)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	-0,5891	0,3471	0,0951	0,8622*	0,7433*	0,0028*
DS	-0,3311	0,1096	0,3841	0,2123	0,0451	0,5834
CTE	-0,9671*	0,9354*	p<0,0001*	-0,3294	0,1085	0,3867
DTE	-0,3723	0,1386	0,3238	0,6398	0,4093	0,0635

* $p < 0,05$.

A Figura 30 ilustra a existência de uma correlação negativa significativa entre o transcrito do gene *rlns* e os níveis dessa proteína no plasma do grupo CTE por 4 semanas.

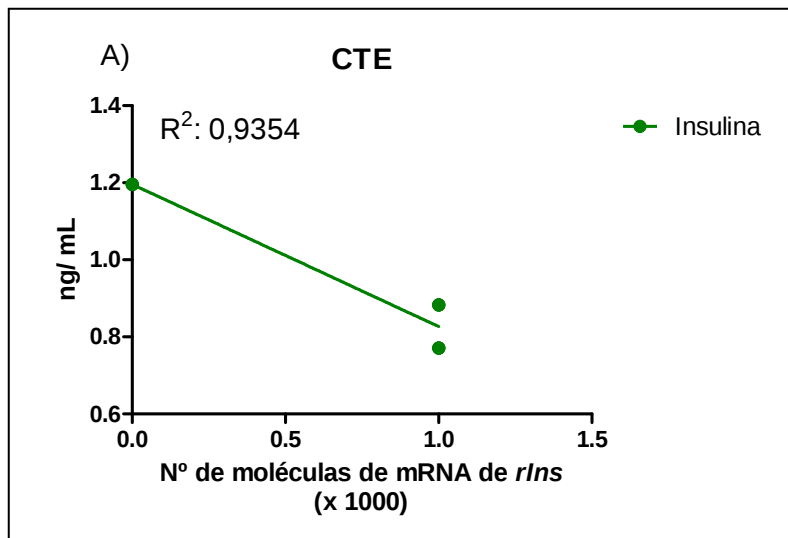


Figura 30: Relação entre número de moléculas de mRNA de *rlns* e níveis de insulina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas. Grupo CTE (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 semanas.

A Figura 31 ilustra a correlação positiva significativa entre o transcrito do gene *rlns* e os níveis dessa proteína no plasma do grupo CS.

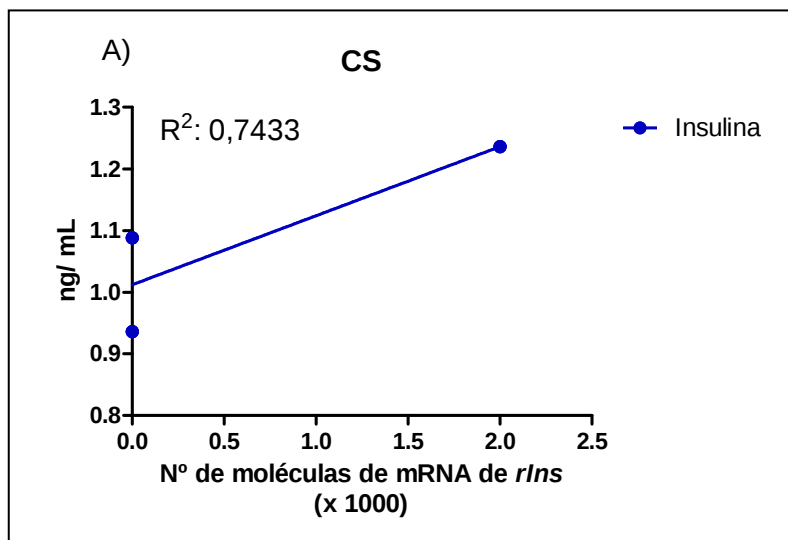
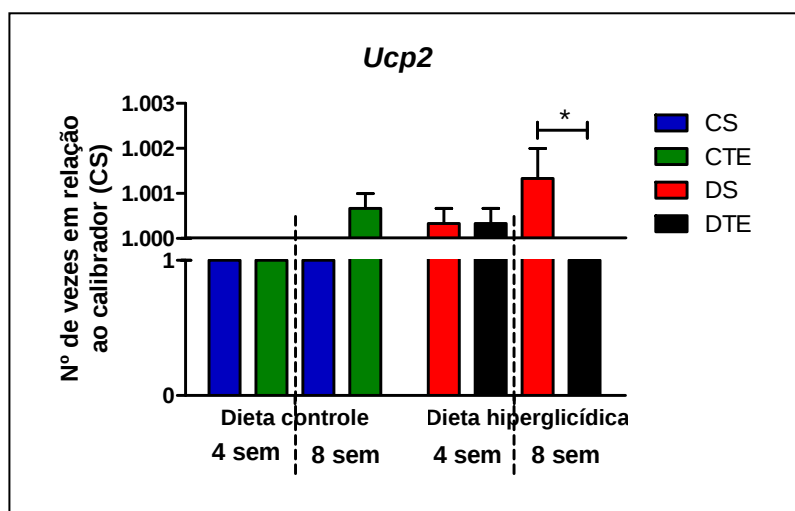


Figura 31: Relação entre número de moléculas de mRNA de *rlns* e níveis de insulina plasmática (ng/mL) (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupo CS (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.2.5 Quantificação dos níveis de mRNA de *Ucp2* no TA retroperitoneal

A análise da do gene *Ucp2* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

A Figura 32 representa o padrão de expressão gênica do gene *Ucp2*, o qual não apresentou diferenças entre os grupos submetidos ao treinamento físico em esteira por 4 semanas. Para os animais treinados por 8 semanas, a associação entre dieta e treinamento reduziu em 0,1 vez a expressão do transcrito no grupo DTE por 8 semanas (em relação ao DS). A comparação da expressão do gene *Ucp2* entre os dois períodos de treinamento não apresentou diferenças.



*p<0,05.

Figura 32: Expressão relativa do gene *Ucp2* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p<0,05$.

Com a finalidade de verificar se o aumento no índice de adiposidade dos animais era acompanhado por aumento nos níveis de mRNA *Ucp2*, realizamos uma correlação linear entre estas variáveis.

A Tabela 23 representa a correlação entre o índice de adiposidade e o número de moléculas de mRNA de *Ucp2*.

Tabela 23: Correlação entre índice de adiposidade e o número de moléculas de mRNA de *Ucp2* de animais submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira.

Grupo	4 semanas (n=3)			8 semanas (n=3)		
	Pearson	R ²	p-valor	Pearson	R ²	p-valor
CS	-	-	-	0,4732	0,2239	0,1982
DS	0,2949	0,0870	0,4410	-0,7693*	0,5918*	0,0154*
CTE	-	-	-	0,6678*	0,4459*	0,0494*
DTE	0,8535*	0,7285*	0,0034*	-0,1060	0,0113	0,7860

*p<0,05.

De acordo com a Figura 33, houve uma correlação positiva significativa entre o índice de adiposidade e os níveis de expressão *Ucp2* para o grupo DTE por 4 semanas.

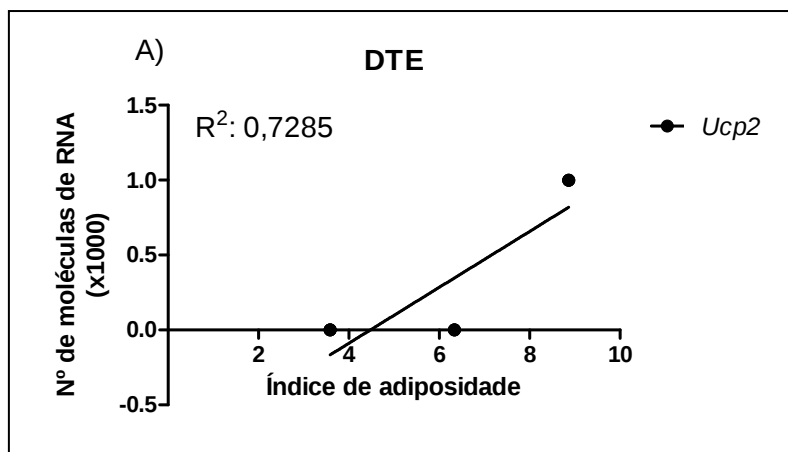


Figura 33: Relação entre índice de adiposidade e número de moléculas de mRNA de *Ucp2* (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 4 semanas. Grupo DTE (A). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 5 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 4 semanas.

A Figura 34A ilustra uma correlação negativa significativa entre o índice de adiposidade e os níveis de mRNA de *Ucp2* do grupo DS que recebeu dieta durante 9 semanas. De modo contrário, a Figura 34B mostra uma correlação positiva significativa entre as variáveis analisadas para o grupo CTE por 8 semanas.

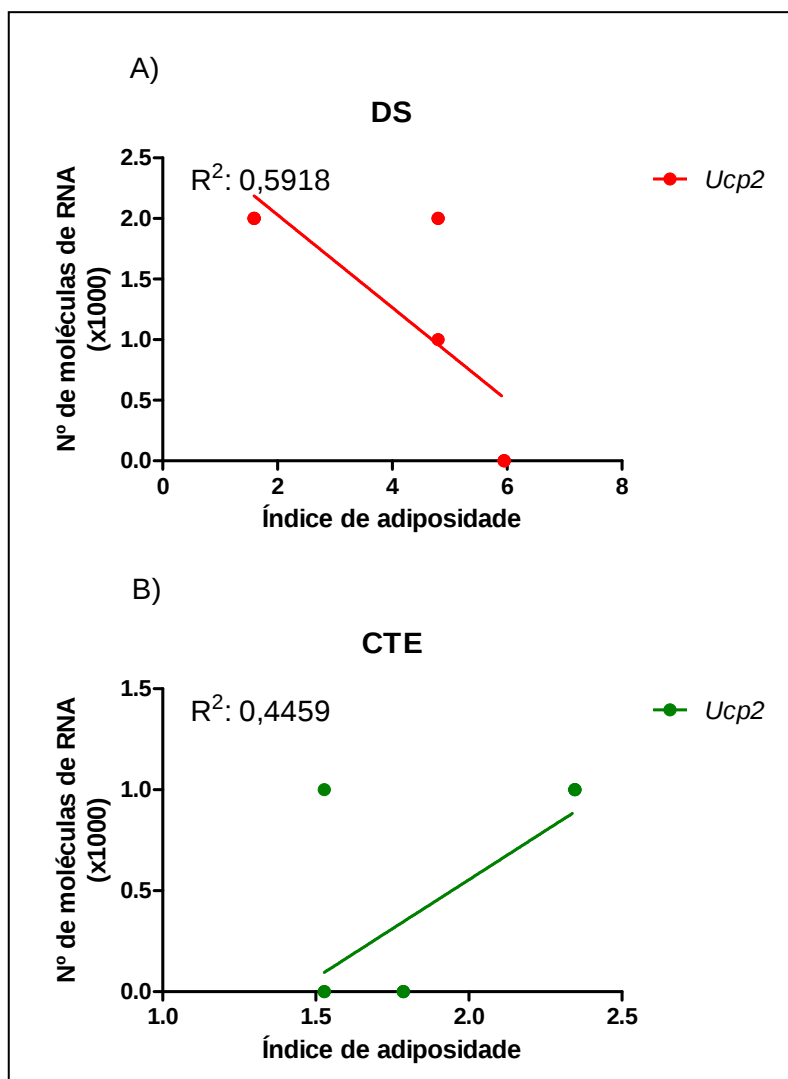


Figura 34: Relação entre índice de adiposidade e número de moléculas de mRNA de *Ucp2* (regressão linear) de animais submetidos a treinamento físico em esteira durante 8 semanas. Grupo DS (A) e CTE (B). Os animais DS receberam dieta hiperglicídica após o desmame durante 9 semanas e os DTE treinamento em esteira rolante durante 8 semanas.

IV.2.6 Quantificação dos níveis de mRNA de *Adra2a* e *Adrb3* no TA retroperitoneal

A análise da expressão dos genes *Adra2a* e *Adrb3* foi realizada utilizando a técnica de qRT-PCR Real Time, conforme descrito em *Metodologia*.

O padrão de expressão dos genes *Adra2* e *Adrb3* no TA retroperitoneal de animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas é mostrado pelas Figuras 35 e 36.

Os níveis de expressão do gene *Adra2a* nos animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas foram iguais aos níveis detectados para o calibrador (CS) (Figura 35).

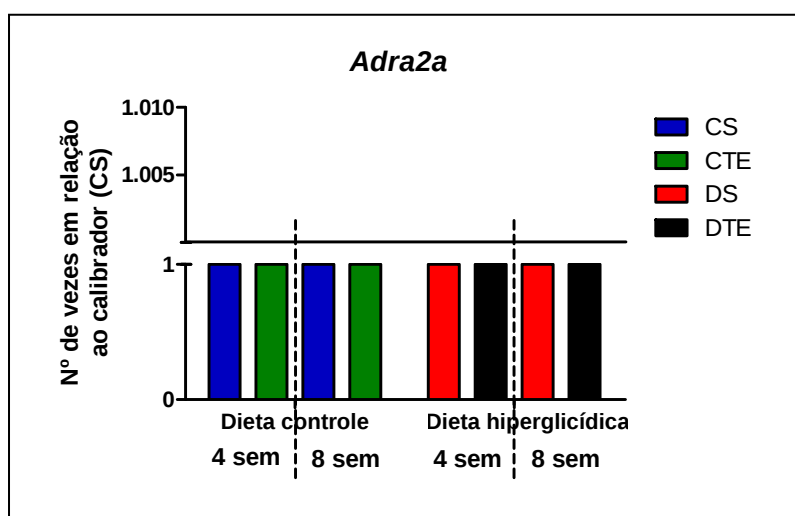


Figura 35: Expressão relativa do gene *Adra2a* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

De acordo com a Figura 36, padrão de expressão do gene *Adrb3* no TA retroperitoneal de animais treinados em esteira por 4 e 8 semanas não apresentou diferenças entre os grupos. Ainda, a comparação da expressão do gene *Adrb3* entre os dois períodos de treinamento também não foi diferente.

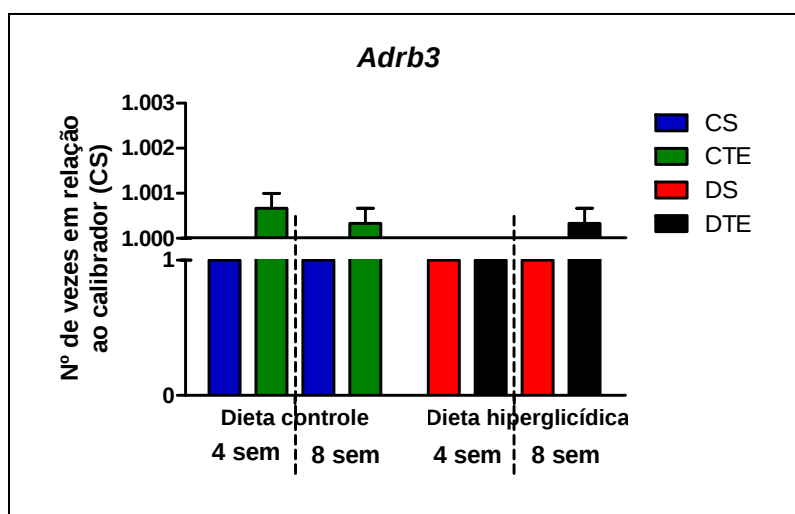


Figura 36: Expressão relativa do gene *Adrb3* no TA retroperitoneal de animais submetidos ao treinamento físico em esteira durante 4 e 8 semanas. A expressão deste gene foi avaliada nos grupos DS, CTE e DTE pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Como gene de referência foi utilizado o gene *RNA18S* e como amostra calibradora o grupo controle sedentário (CS).

O efeito da dieta e/ou do treinamento sobre a expressão gênica relativa foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) TWO-WAY (Teste de Bonferroni) e considerado significativo quando $p < 0,05$.

V DISCUSSÃO

A obesidade representa o arquétipo da complexidade fenotípica, uma vez que o peso corporal pode ser afetado por diversos fatores (COMUZZIE e col., 1998, PALOU e cols., 2000).

Quando ingestão energética excede o gasto, resultando em obesidade, ocorre uma série de mudanças genéticas e/ ou adquiridas no controle da ingestão alimentar (WOODS e cols., 1998; SCHWARTZ e cols., 2000), que determina a sensação de saciedade e apetite através da inter-relação entre sinais internos (principalmente leptina) e fatores ambientais; na eficiência energética (LOWELL e cols., 2000), particularmente a ativação da termogênese mediada pela UCP1; e na adipogênese (MORRINSON e col., 1999; WU e cols., 1999), processo pelo qual ocorre a formação de adipócitos controlada pela inter-relação de fatores de transcrição.

Enquanto a variação genética entre indivíduos é considerada o principal fator para o desenvolvimento da obesidade (BOUCHARD e cols., 1990; ALLISON e cols., 1996; BARSH e cols., 2000), muito se tem discutido a respeito da contribuição dos fatores ambientais como o segundo responsável pela epidemia da doença (LEVINE e col., 1999; HILL e cols., 2003), destacando-se a capacidade de o indivíduo expandir o seu TA num ambiente “obesogênico” como um fator vital na determinação da progressão da patologia (KOZAK e cols., 2010).

Os efeitos do ambiente nutricional sobre a adiposidade têm sido estudados em modelos experimentais desde a década de 1960 (McCANCE, 1962), enfatizando a importância do tipo de alimentação pós-desmame sobre a composição e distribuição corporal dos depósitos adiposos (OZANNE, 2004). Vale ressaltar que o modelo experimental de obesidade induzida pela dieta, particularmente em roedores, partilha de características comuns à obesidade humana, sendo possível desenvolver uma investigação aprofundada sobre os seus efeitos nas vias centrais que regulam a homeostase energética.

Em nosso trabalho propusemos um modelo experimental de obesidade iniciado após o desmame e desafiado por mais uma variável, o treinamento físico em esteira rolante, a fim de se avaliar o comportamento da adiposidade corporal mediante um fator predisponente ao gasto energético. Ainda, foi adicionada a

variável tempo para investigar as alterações sobre o balanço energético num animal “púbere” e num “adulto jovem”.

Para analisar a indução da obesidade pela dieta no nosso modelo, foram avaliados parâmetros biométricos (peso, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs), sendo que o desempenho físico dos animais foi determinado pela capacidade de realização de trabalho.

A análise do peso corporal e da ingestão alimentar do nosso modelo mostrou que não houve diferenças entre o ganho de peso dos grupos experimentais treinados por 4 e 8 semanas (Tabelas 07 e 08), nem para a ingestão alimentar e calórica dos mesmos (Tabela 09). Entretanto, a análise do peso corporal de uma forma isolada não é um bom parâmetro indicativo de obesidade (CESARETTI e cols., 2006). O índice de Lee dos animais também não apresentou diferenças (Tabela 12). Por se tratar de um parâmetro biométrico que indica o estado nutricional do animal (LEE, 1929), ele não se correlaciona adequadamente com a gordura corporal de ratos normais, pois o CNA é insatisfatório para estimar a massa livre de gordura em animais de mesma idade e de mesma história nutricional (SEPHENS, 1980). A literatura descreve que alterações significativas no índice de Lee são observadas em modelos experimentais de obesidade por lesão hipotalâmica, especificamente do núcleo arqueado, por infusão de glutamato monossódico (LEME e cols., 2008; ARAÚJO e cols., 2009) e em modelos de obesidade que recebem dieta hipercalórica por mais de 9 semanas após o desmame (CESARETTI e cols., 2006). Estes relatos nos motivaram a utilizar o índice de adiposidade (Figura 13B) para verificar o grau de obesidade dos grupos experimentais, o qual apresentou alterações decorrentes da associação entre dieta e treinamento para os dois períodos avaliados. A avaliação do grau de adiposidade também foi realizada pela correlação linear (coeficiente de Pearson) entre o ganho de peso e o índice de adiposidade. A correlação positiva observada entre estas duas variáveis nos grupos DS e DTE por 4 semanas (Figura 15) sugere que 5 semanas de dieta após o desmame são suficientes para induzir obesidade, uma vez que o ganho de peso foi acompanhado pelo aumento da adiposidade corporal (LEVIN, 1992; GREGOIRE e cols., 1998; GESTA e cols., 2007). Para o grupo submetido a 9 semanas de dieta,

houve correlação positiva significativa para as mesmas variáveis somente para o grupo DS (Figura 13A), sugerindo que o aumento do ganho de peso do grupo DTE não foi decorrente apenas do aumento de gordura corporal (BROUNS e cols., 1998; EGUCHI e cols., 2008).

De modo geral, os nossos resultados mostraram um aumento no depósito retroperitoneal decorrente da associação entre dieta e treinamento após 8 semanas e um aumento do TA inguinal induzido pela dieta após 9 semanas, enquanto a associação entre dieta e treinamento resultou num aumento do coxim a partir de 4 semanas. Ainda, a comparação entre os dois períodos de treinamento mostrou que a dieta não permite a redução do coxim inguinal no grupo DS, observada nos animais CS, CTE e DTE após 8 semanas (Tabela 10). Estes resultados são corroborados pelos trabalhos de CHAVES e cols. (2006), que relataram que o excesso de carboidratos da dieta aumenta a taxa de síntese de ácidos graxos no TAB, bem como a sua síntese, resultando em acúmulo de gordura corporal, e por outros autores que descreveram um aumento nos depósitos retroperitoneal e epididimal de ratos alimentados com dietas ricas em carboidratos e lipídeos (FESTUCCIA e cols., 2003a; FESTUCCIA e cols., 2003b; CESARETTI e cols., 2006; BRITO e cols., 2006; EGUCHI e cols., 2008). Visto que a obesidade é caracterizada por um aumento de peso decorrente de um aumento na adiposidade, nosso modelo foi eficiente para induzir obesidade em ratos, independentemente do período de oferecimento da dieta (5 ou 9 semanas).

Nossos resultados mostraram que o TAM teve seu aumento influenciado pela dieta e a associação da mesma com o treinamento físico não impediu este efeito para os dois períodos avaliados (Figura 12). É bem descrito na literatura que dietas ricas em carboidratos são capazes de estimular a atividade simpática para o TAM, resultando em aumento do peso do tecido devido ao aumento do número de células (LEVIN, 1992; MIGLIORINI e cols., 1997; BOWERS e cols., 2004; CANNON e cols., 2004; SELL, 2004; CHAVES e cols., 2006; FESTUCCIA e cols., 2008). Isso ocorre porque os adipócitos marrons são densamente innervados pelo SNS, o qual libera NE que ativa a proteína G acoplada a receptores β adrenérgicos, iniciando a transdução do sinal que culmina na ativação da expressão de proteínas mitocondriais

desacopladoras (UCPs), responsáveis pela geração de calor sob estímulo simpático (ROTHWELL e cols., 1983; MIGLIORINI e cols., 1997; SELL, 2004).

A análise da capacidade de realização de trabalho dos animais mostrou que o exercício físico de início precoce (pós-desmame) resulta em melhoras no desempenho físico a partir de 4 semanas (Figura 16), proporcionando uma redução no TA inguinal a partir deste período e impedindo o desenvolvimento do TA retroperitoneal após 8 semanas. Entretanto, este efeito é observado apenas nos animais que recebem dieta padrão balanceado (CTE). Como não houve diferença de peso entre os grupos e ocorreu uma redução de gordura subcutânea no grupo CTE, possivelmente o treinamento físico em esteira por 4 semanas levou ao aumento de massa magra e de glicogênio muscular (BROUNS e cols., 1998; EGUCHI e cols., 2008). Estudos prévios demonstraram que o treinamento físico aumenta a capacidade de mobilização da gordura existente e que a predominância da utilização dos substratos de fonte lipídica está fortemente regulada pelo tipo, duração e intensidade do exercício, assim como pela ação hormonal e dieta ingerida (RUBY e cols., 1994; EGUCHI e cols., 2008), corroborando com os resultados descritos neste trabalho e sugerindo a ocorrência de um balanço energético negativo em resposta ao treinamento, aumentando o gasto energético, através do trabalho muscular. Entretanto, a eficiência do exercício parece ocorrer apenas para quem recebe uma dieta balanceada, uma vez que não foram observadas reduções nos depósitos dos animais que receberam dieta hiperglicídica e foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento físico em esteira (Figura 11).

Também foi objetivo deste trabalho determinar o efeito da dieta hiperglicídica e do treinamento físico em esteira sobre os parâmetros bioquímicos estabelecidos para confirmação da obesidade (leptina, insulina e NEFAs). Os resultados sobre os níveis plasmáticos de leptina são apresentados na Tabela 15 e Figura 17. Foi observado que a dieta hiperglicídica induziu um aumento de 47% nos níveis de leptina circulantes e que o treinamento físico em esteira por 4 semanas provocou uma redução nos níveis plasmáticos de leptina tanto para o grupo CTE quanto para o grupo DTE, o que não foi observado para os animais que treinaram em esteira por 8 semanas (Figura 17). Além disso, o exercício físico por 8 semanas não inibiu o

efeito da dieta sobre a hiperleptinemia. Também foi possível observar que a redução nos níveis de leptina observadas no grupo CTE por 4 semanas não foram acompanhadas por alterações significativas na gordura corporal, enquanto o treinamento físico em esteira por 8 semanas, apesar de reduzir os depósitos de gordura, não foi capaz de impedir o desenvolvimento da hiperleptinemia (Figuras 11 e 17).

Vale ressaltar que os resultados descritos na literatura correlacionando níveis de leptina circulantes e exercício físico, são conflitantes, além disso, esta relação pode ser influenciada pela adiposidade e gênero. RACETE e cols. (1997) demonstraram que o aumento da atividade física de moderada intensidade, em curto prazo, não altera o metabolismo da leptina (produção e concentração na circulação) em humanos do sexo masculino com idade de $38,4 \pm 1,7$ anos. PÉRUSSE e cols. (1997) determinaram os níveis de leptina plasmática, antes e após 12 minutos de cicloergometria a 50W, e imediatamente após o alcance do esforço máximo, e não verificaram alterações nos níveis plasmáticos de leptina em resposta ao efeito agudo da atividade física. Outros estudos reforçam que o treinamento físico não é capaz de reverter o estado de hiperleptinemia (KRAEMER e cols., 2002). No entanto, alguns estudos mostram reduções nos níveis de leptina plasmática após treinamento físico, associados, principalmente, a diminuição do peso do TA (KIMURA e cols., 2004). Outra hipótese é que a redução da concentração desse hormônio em decorrência do exercício pode ser devida a alterações da disponibilidade ou do fluxo de nutrientes nos adipócitos, decorrente da oxidação de substratos energéticos para o exercício, como a glicose e os ácidos graxos (KRAEMER e cols., 2002; HULVER e cols., 2003).

Por outro lado, como a leptina exerce um papel central na regulação do balanço energético e do peso corporal, espera-se que a função deste hormônio esteja alterada na obesidade. Neste sentido, os resultados apresentados neste trabalho corroboram essa hipótese e também sugerem que não houve qualquer efeito compensatório da alta concentração de leptina circulante sobre a redução da ingestão energética ou do peso corporal dos animais (Tabelas 07, 08 e 09), sugerindo que a hiperleptinemia disparou mecanismos de resistência a este

hormônio. Essa hipótese parece muito atrativa, uma vez que, o mecanismo potencial de resistência a leptina induzida pela dieta, causando a hiperleptinemia na obesidade, inclui diminuição do acesso da leptina a alvos hipotalâmicos, redução na responsividade dos neurônios centrais à leptina ou modificação na transdução do sinal mediada pelo peptídeo nos tecidos-alvos, bem como um somatório destes fatores (CONSIDINI e cols., 1995; HAMILTON e cols., 1995; LÖNNQUIST e cols., 1995; MAFFEI e cols., 1995; CONSIDINI e cols., 1996; MAFFEI e cols., 1996; MYERS e cols., 2008; MORRISON e cols., 2009). Recentemente, KOZAK e cols. (2010) sugeriram que o aumento de peso decorrente da obesidade induzida pela dieta pode ser mediado pela resistência a leptina, resultando num ciclo vicioso que culmina com o agravamento do quadro patológico.

Além disso, dados da literatura relatam que a perda ou ganho de peso corporal parecem provocar, respectivamente, a diminuição e o aumento das concentrações de leptina. Um bom exemplo deste comportamento foi descrito por CONSIDINE e cols. (1996) que observaram uma redução de 10% do peso corporal em humanos obesos é suficiente para reduzir em 53% os níveis de leptina sérica. Por outro lado, 10% de aumento do peso corporal causaram um aumento de 300% nos níveis de leptina (KOLACZYNSKI e cols., 1996). Esses dados corroboram com a hipótese de que quando o balanço energético está em equilíbrio, a expressão e a secreção de leptina refletem a massa de tecido adiposo tanto em ratos quanto em humanos. Por outro lado, a privação de alimentos (12h a 48h) resulta na queda significativa da expressão da leptina (LI e cols., 1997). Alterações mais sutis no balanço energético também produzem efeitos profundos nessa expressão. Considerando esses dados e os resultados descritos neste trabalho, a molécula de leptina não funcionaria apenas como uma molécula sinalizadora ao cérebro sobre a situação dos depósitos de energia do corpo, mas também como um sensor do balanço energético (HOUSEKNECHT e cols., 1998). Desta forma, para avaliar se havia uma correlação entre dieta hiperglicídica e treinamento físico em esteira com a secreção de leptina e expressão do gene *ob* e do seu receptor, os níveis destes mRNAs foram avaliados utilizando a técnica de qRT-PCR no TA retroperitoneal. Os resultados da Figura 26 mostram que não há diferença entre os níveis de mRNA

para leptina entre os grupos de animais com 4 semanas de dieta/ treinamento. Para os animais treinados por 8 semanas, os níveis de expressão do gene aumentaram 0,3 vezes no grupo DS e 1 vez no grupo CTE em relação ao calibrador, enquanto a associação entre dieta e treinamento reduziu em 0,7 vezes os níveis do transcrito no grupo DTE (em relação ao grupo CTE). Apesar de até o momento não termos avaliado a expressão do gene *ob* no TA inguinal, nem determinado o tamanho dos adipócitos, os resultados sugerem que não há uma correlação direta entre níveis de mRNA e leptina neste modelo experimental. Vale ressaltar que foi utilizado como critério uma diferença significativa um aumento de pelo menos duas vezes nos níveis de mRNA. HARRIS e cols. (2002) demonstraram que a expressão do mRNA de leptina em ratos é maior no retroperitoneal e parametrial que perirenal e inguinal, mas não correlaciona com a propensão de diferentes depósitos ampliarem pela diferenciação ou hipertrofia (WAGONER e cols., 2006). A continuidade desta linha de investigação, avaliando a expressão do gene *ob* no TA inguinal poderá indicar mecanismos de regulação na síntese da leptina no tecido adiposo. A correlação entre os níveis de mRNA de leptina e da proteína mostrou-se inexistente em todos os grupos avaliados, exceto CTE por 8 semanas.

Com relação ao padrão de expressão do receptor de leptina, não foi observado nenhum efeito direto da dieta, do treinamento e da associação dieta/ treinamento em sua expressão (Figura 27). Foi descartada a hipótese de o *primer* ser inespecífico, pois as análises de bioinformática mostraram que a sequência utilizada era referente à isoforma longa do receptor. A isoforma longa tem o domínio de sinalização intracelular, sendo a única capaz de iniciar a cascata de transdução de sinal. As outras isoformas, que também são geradas por *splicing* alternativo e processamento pós-traducional, parecem agir como sequestradores e transportadores, ligando-se à leptina sem consequente transdução do sinal (SOUSA e cols., 2009). A literatura não traz grandes contribuições sobre alterações na taxa de transcrição dos receptores periféricos de leptina em animais com obesidade induzida pela dieta; dessa forma, novos experimentos são necessários para compreendermos se há um efeito direto da dieta/ treinamento sobre os níveis de RNAm do *rLep*.

Também foi objetivo deste trabalho avaliar o efeito da dieta, do treinamento e da associação dieta/ treinamento sobre os níveis plasmáticos de insulina. Os resultados apresentados pela Tabela 16 e Figura 18 mostram que a associação entre dieta e treinamento resultou numa redução nos níveis de insulina no grupo DTE por 4 semanas. Entretanto, não houve alterações nos níveis plasmáticos de insulina nos animais submetidos ao treinamento físico em esteira por 8 semanas. A comparação entre os dois períodos de treinamento estudados mostrou um aumento nos níveis circulantes do hormônio no grupo CTE (Figura 18). Posteriormente, foi avaliado o padrão de expressão do *rlns*. Como mostra a Figura 29, não foram encontradas diferenças significativas na expressão do gene *rlns* no TA retroperitoneal correlacionada com a dieta, treinamento ou associação entre ambos, entretanto, foi possível verificar uma correlação negativa significativa entre o transcrito do gene *rlns* e os níveis de insulina no plasma do grupo CTE por 4 semanas (Figura 30), sugerindo uma redução dos níveis circulantes do hormônio decorrente de um aumento na expressão do *rlns* neste grupo. Estudos demonstraram que a sensibilidade à insulina pode aumentar com exercícios físicos, independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal (O'DONOVAN e cols., 2005), e que o principal efeito do exercício pode ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose (GLUT-4) na musculatura esquelética (TERAN-GARCIA e cols., 2005). Por outro lado, a prática de exercício físico promove um aumento na sensibilidade à insulina, devido ao aumento da oxidação de ácidos graxos, da captação e utilização da glicose no tecido adiposo e no músculo esquelético e de redução da produção hepática de glicose, levando a um melhor controle dos níveis séricos de glicose, de ácidos graxos livres e de TAG (RAJALA e cols., 2003; MATTISON e cols., 2003). Esses efeitos podem ser observados até em uma única sessão de exercício, podendo perdurar por várias horas após o término da atividade e ainda serem incorporados de forma crônica com a prática regular do exercício (GOODYEAR e col., 1998). Durante o exercício físico a contração muscular aumenta a translocação de GLUT4 independentemente da presença de insulina.

Também foi observado neste trabalho uma correlação positiva significativa entre o transcrito do gene *rlns* e os níveis de insulina no plasma do grupo CS (Figura 31), sugerindo um aumento na transcrição do mRNA de *rlns* é acompanhado pelo aumento da insulina plasmática. Esse resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo tamanho das reservas adiposas dos animais do grupo CS, uma vez que a secreção de insulina está diretamente relacionada ao balanço energético (O'DONOVAN e cols., 2005).

Considerando que o exercício físico causa uma série de modificações metabólicas no organismo, o desenho experimental deste trabalho nos permitiu avaliar um efeito agudo (4 semanas) e um efeito crônico (8 semanas) do treinamento físico em esteira. Esperávamos que, no efeito agudo, houvesse um aumento do gasto energético necessário para a realização do exercício e a mobilização de substratos energéticos específicos, enquanto na forma crônica, considerando a adaptação do organismo ao treinamento, almejávamos a modificação na composição corporal e a capacidade aumentada de armazenar carboidratos e TAG no músculo esquelético. Como a insulina é secretada em resposta à alimentação e à leptina, secretada em proporção direta ao metabolismo dos adipócitos, avaliamos se haveria uma correlação entre os níveis de insulina e leptina plasmáticos. Os resultados da Figura 17 mostram que não houve uma correlação direta entre insulina e leptina. Desta forma, a hipótese levantada foi de que a dieta hiperglicídica elevou os níveis de leptina, entretanto, a ativação simpática induzida pela dieta provavelmente impediu o efeito da insulina sobre a leptina. Sabe-se que a insulina regula a expressão do gene *ob* em ratos e que os adrenocetores $\beta 3$ exercem papel central na regulação da liberação de leptina pelos adipócitos (GETTYS e cols., 1996), entretanto, também são responsáveis pela inibição adrenérgica do transporte de glicose estimulado pela insulina em adipócitos de ratos (CARPÉNÉ e cols., 1993), bloqueando completamente o efeito da insulina sobre a produção de leptina, devido à ativação simultânea de PKA. Esses relatos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

Dando continuidade na investigação dos efeitos da dieta hiperglicídica sobre o metabolismo no TA, nosso próximo objetivo foi investigar os níveis do NEFAs. Os

resultados da Figura 19 mostram que não houve um efeito da dieta, treinamento e da associação dieta/ treinamento sobre os níveis de NEFAs. Vale ressaltar que apesar da hiperleptinemia observada nos animais que receberam dieta por 5 e 9 semanas, não houve aumento dos NEFAs nestes grupos. COLLINS e cols. (1997) relataram que uma redução na função dos receptores β -adrenérgicos no TA após o consumo crônico de dietas ricas em lipídeos (58% de gordura) sugerindo uma menor eficiência do tônus simpático. Essas observações analisadas em conjunto com os resultados descritos neste trabalho levantam questões interessantes como, por exemplo, que o consumo crônico da dieta hiperglicídica por animais “adultos jovens” pode exercer o mesmo efeito do consumo crônico de dieta hiperlipídica, entretanto, novos experimentos estão sendo realizados para confirmar essa hipótese.

Foi observado uma correlação negativa significativa entre os níveis de leptina e NEFAs circulante do grupo DTE por 8 semanas (Figura 20), sugerindo que o aumento da leptina circulante foi acompanhado pela redução nos níveis plasmáticos de ácidos graxos. A literatura relata que o aumento do gasto energético pela termogênese é decorrente da elevação do *turnover* da NE pela leptina em tecidos termogênicos (COLLINS e cols., 1996) e do favorecimento da expressão de UCPs (SCARPACE e cols., 1997; ZHOU e cols., 1997; CUSIN e cols., 1998; COMMINS e cols., 1999; ROURU e cols., 1999; SCARPACE e cols., 1998), além de estimular a taxa de lipólise e a expressão de enzimas envolvidas com a oxidação de ácidos graxos em células adiposas (WANG e cols., 1999; SIEGRIST-KAISER e cols., 1997) e pancreáticas (ZHOU e cols., 1997), causando uma redução do conteúdo de TAG nestas células que não é acompanhado pela liberação de ácidos graxos (WANG e cols., 1999). Juntos, estes resultados sugerem que a leptina favorece o consumo interno de ácidos graxos como combustíveis termogênicos, o que corrobora os resultados descritos.

O próximo objetivo foi avaliar a expressão de *Ucp1*, *Adrb3* e *Adra2a* no TAM. Vale ressaltar que a estimulação do SNS via receptores β_3 provoca a hidrólise de ácidos graxos e leva ao desacoplamento da produção de energia pela indução da expressão das UCPs, tanto no TAM quanto no TAB de ratos (SCARPACE e col., 1998). Entretanto, o mecanismo da termogênese adaptativa é bem compreendido

apenas para o TAM, cuja produção de calor pode ser estimulada pelo frio (CIT – *cold-induced thermogenesis*) e pela dieta (DIT – *diet-induced thermogenesis*) (ROTHWELL e cols., 1979; NICHOLLS e cols., 1984) e é direcionado pela UCP1 (PALOU e cols., 2000).

Os resultados da Figura 21 mostram que não houve um efeito direto do treinamento sobre a expressão da *Ucp1* para os animais submetidos a 4 semanas de treinamento em esteira, enquanto após 9 semanas de dieta houve um aumento 2,6 vezes na expressão do gene no grupo DS (em relação ao CS). O treinamento em esteira por 8 semanas induziu um aumento significativo expressão da *Ucp1* no grupo CTE, ao passo que a associação entre dieta e treinamento reduziu em 2,2 vezes os níveis do transcrito no grupo DTE. A comparação da expressão gênica do *Ucp1* entre os dois períodos de treinamento mostrou um aumento de 2,5 vezes em sua expressão no grupo DS e um aumento significativo no grupo CTE por 8 semanas, sugerindo que a dieta em longo prazo provoca mudanças no mecanismo termogênico que são influenciadas pela associação da mesma com o treinamento em esteira por 8 semanas.

É bem estabelecido pela literatura que, em animais de laboratório, o oferecimento de dietas de cafeteria em longo prazo é acompanhado pela hiperplasia do TAM e aumento da expressão de UCP1 (PUIGSERVER e cols., 1991; ROCA e cols., 1999), e também de UCP2 (ROCA e cols., 1999) no TAB, uma resposta que confere uma relativa proteção contra a obesidade (ROTHWELL e col., 1979). Os nossos resultados apresentaram esta correlação em curto prazo (4 semanas), uma vez que houve uma correlação positiva significativa entre o aumento do TAM e os níveis de *Ucp1* nos animais que receberam dieta (DS) (Figura 22). Entretanto, foi possível verificar que o aumento do TAM decorrente da dieta nos animais treinados por 8 semanas em esteira foi acompanhado de uma redução nos níveis de mRNA do gene *Ucp1* nos grupos DS e DTE, efeito ilustrado pela existência de uma correlação negativa significativa entre as variáveis nestes grupos (Figuras 23A e C, respectivamente), enquanto o treinamento *per si* provocou um aumento na transcrição do gene provavelmente em decorrência do aumento da massa do tecido,

observado nos animais do grupo CTE por 8 semanas, devido à existência de uma correlação positiva significativa entre as duas variáveis (Figura 23B).

A seguir foi avaliado o efeito da dieta, do treinamento e da associação entre ambos sobre a expressão de *Adra2a* e *Adrb3* no TAM. A Figura 24 mostra que os níveis de expressão do gene *Adra2a* foram iguais ao do calibrador (CS). Por outro lado, foi detectado que tanto a dieta quanto o treinamento em esteira por 4 semanas não induziram alterações na expressão de *Adrb3*, enquanto após 8 semanas ocorreu um aumento de 0,2 vezes na expressão do gene no grupo DS e de 0,4 vezes para CTE. Entretanto, a associação entre dieta e treinamento reduziu os níveis de expressão do *Adrb3* no DTE 0,3 vezes (Figura 25). DEIULLIS e cols. (2010) mostraram que uma exposição crônica ao frio altera a cascata de transdução do sinal envolvendo os adrenoreceptores no TAM, sugerindo que estímulo simpático crônico no tecido modula esta atividade. Não podemos descartar a possibilidade de que a dieta estimula o tônus simpático de forma crônica e, portanto, influencia a taxa de transcrição destes genes. Entretanto, novos experimentos são necessários para confirmarmos estes resultados.

Neste trabalho, a termogênese adaptativa também foi avaliada indiretamente pela expressão de *Ucp2* no TA retroperitoneal, bem como por sua associação com o índice de adiposidade. Como apresentado pela Figura 32, não houve diferenças na expressão do gene dos animais submetidos a 4 semanas de treinamento, ao passo que a associação entre dieta e treinamento físico em esteira por 8 semanas reduziu em 0,1 vez a expressão do transcrito no grupo DTE (em relação ao DS). Em relação ao índice de adiposidade e à expressão de *Ucp2*, foi possível verificar uma correlação positiva significativa entre as variáveis para o grupo DTE por 4 semanas (Figura 33), sugerindo que o aumento da massa de gordura neste grupo foi acompanhado por uma melhora na termogênese adaptativa induzida pela dieta. Entretanto, para o grupo submetido ao treinamento físico em esteira por 8 semanas foi observada uma correlação negativa significativa entre o índice de adiposidade e os níveis de mRNA do transcrito no grupo DS (Figura 34A), sugerindo que a oferta da dieta hiperglicídica em longo prazo provocou uma piora na eficiência energética, ao passo que a existência de uma correlação positiva significativa entre as variáveis

analisadas para o grupo CTE por 8 semanas (Figura 34B) sugere que o treinamento físico associado a uma dieta balanceada melhora a termogênese adaptativa.

A relação entre níveis de *Ucp2* e massa de gordura é controversa na literatura. MILLET e cols. (1997) estudaram indivíduos magros e obesos e mostraram correlação direta entre o índice de massa corporal (IMC) e a expressão do mRNA da *Ucp2*. Enquanto a dieta era proporcional ou excessiva à necessidade de energia, a expressão de *Ucp2* permanecia aumentada, provavelmente como um mecanismo para evitar o acúmulo de gordura. Por outro lado, OBERKOFER e cols. (1998), relataram que a expressão gênica da *Ucp2* foi significativamente menor no TA de obesos em comparação aos indivíduos magros, permanecendo menor mesmo após a redução do peso corporal. Além disso, não foi observada uma influência significativa da dieta sobre a expressão da proteína desacopladora nem a existência de uma correlação positiva entre massa de gordura e expressão da *Ucp2* (OBERKOFER e cols., 1998).

A análise da expressão dos genes *Adra2a* e *Adrb3* também foi avaliada no TA retroperitoneal (Figuras 35 e 36, respectivamente). Os níveis de mRNA do gene *Adra2a* foram similares ao do calibrador (grupo CS) (Figura 35), enquanto não houve diferenças na expressão de *Adrb3* nos grupos submetidos a 4 e 8 semanas de treinamento físico em esteira. Poucos são os dados que descrevem a capacidade da dieta em alterar o mRNA dos receptores adrenérgicos α_2 e β_3 . Nossos resultados são provenientes do TA retroperitoneal e dados da literatura apontam para uma expressão diferencial destes receptores no TA inguinal (MIRANDA e cols., 2010). Portanto, novos experimentos serão formulados para avaliar a expressão destes receptores adrenérgicos no TA inguinal.

VI CONCLUSÃO

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- O modelo proposto induz obesidade após 5 semanas de dieta, uma vez que o ganho de peso dos animais que recebem dieta hiperglicídica é decorrente do aumento da gordura corporal e, a partir deste período, é observada hiperleptinemia nos animais;
- A distribuição da adiposidade corporal é influenciado pela dieta, pelo treinamento e pela associação entre ambos.
- A dieta não altera o TA retroperitoneal, mas a associação com o treinamento resulta no aumento do tecido após 8 semanas. Sobre o TA inguinal, a dieta exerce o seu efeito a partir de 9 semanas, enquanto o resultado da sua associação com o treinamento aumenta o depósito a partir de 4 semanas. Ainda, a comparação entre os dois períodos de treinamento mostra que a dieta não permite a redução do coxim inguinal no grupo DS, observada nos animais CS, CTE e DTE após 8 semanas. O TAM tem seu aumento influenciado pela dieta e a associação da mesma com o treinamento físico não impede este efeito para os dois períodos avaliados.
- O exercício físico de início precoce (pós-desmame) resulta em melhoras no desempenho físico dos animais a partir de 4 semanas, proporcionando uma redução no TA inguinal a partir deste período e impedindo o desenvolvimento do TA retroperitoneal após 8 semanas. Entretanto, este efeito é observado apenas nos animais que recebem dieta padrão balanceada (CTE).
- O treinamento em esteira por 4 semanas atenua a hiperleptinemia provocada pela dieta em “ratos púberes”, mas este efeito não é observado em longo prazo (8 semanas);
- A expressão gênica de *Ucp1* e *Adrb3* no TAM é aumentada pela dieta após 9 semanas e a associação com o treinamento resulta numa queda destes níveis.
- A expressão de *Leptina* no TA retroperitoneal foi influenciada pela dieta e pelo treinamento após 8 semanas, mas a associação entre dieta e treinamento resultou numa diminuição dos seus níveis. Ainda, este aumento no transcrito

não foi acompanhado pelo aumento da proteína plasmática, exceto para o grupo CTE por 8 semanas.

- A eficiência energética é influenciada pelo treinamento após 8 semanas, corroborada pelo aumento da expressão de *Ucp1* e *Adrb3* no TAM e *Ucp2* no TAB apenas de animais que recebem dieta balanceada.

Sendo assim, a análise dos dados apresentados sugere que um período de 5 semanas de dieta é suficiente para o estabelecimento de um modelo de obesidade e que a capacidade de realização de trabalho é aumentada pelo treinamento físico em esteira a partir de 4 semanas. Além do mais, o treinamento físico provoca alterações no perfil metabólico que não são mantidas após 8 semanas, havendo uma adaptação dos animais ao desafio proposto e o estabelecimento de alterações metabólicas mais atenuadas no tecido adiposo.

VII PERSPECTIVAS

O conhecimento de um crescente número de genes e moléculas implicantes nos três tipos de processo que levam à obesidade (comportamento alimentar, eficiência energética e adipogênese) e de suas relações metabólicas levará à compreensão dos eventos moleculares do sistema de regulação do peso corporal e das vias centrais que regulam a homeostase energética, fornecendo subsídios para o surgimento de novos métodos de controle da obesidade. Assim, futuros experimentos serão realizados para:

- Analisar a expressão de genes envolvidos com a diferenciação celular de pré-adipócitos (*Dlk*, *Smad 4*), com o metabolismo lipídico (*Fabp4*, *Gpc4*) e de fatores de transcrição ativados no processo (*HoxA5*, *Ppar γ 2*, *Stat-3*), além de genes relacionados ao proteassoma [*Psma6* (*Alfa6*), *Psmd4* (*RPN10*)] , fosforilação (*Mapk3*) e modificações pós-traducionais (ubiquitinação e sumoilação) [*Ubiquitina C* e *Ube2g1* (*Ubc7*), *Smt3_Sumo1* e *Ube2i* (*Ubc9*)];
- Analisar a expressão gênica relativa de *Leptina*, *rLep*, *rIns*, *Ucp2*, *Adra2* e *Adrb3* no TA inguinal;
- Mensurar a atividade da enzima *citrato sintase* no músculo sóleo dos animais que treinaram em esteira por 4 e 8 semanas, por se tratar de uma enzima com a modulação induzida pelo exercício e estabelecer a intensidade do treinamento em cada período avaliado;
- Estabelecer um modelo precoce (após o desmame) de treinamento físico por natação (sem carga) e avaliar todos os parâmetros mensurados no treinamento físico em esteira, inclusive a comparação entre os dois modelos e entre as implicações metabólicas resultantes dos diferentes tipos de treinamento;

VIII REFERÊNCIAS

- AHIMA R. S.; FLIER, J. S. *Adipose Tissue as an Endocrine Organ*. Trends Endocrinol Metab v.11, p.327-32, 2000a
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. *Leptin*. Annu Rev Physiol, v.62, p.413-437, 2000b.
- AHLHAUD, G.; HAUNER, H. *Development of White Adipose Tissue*. IN: Bray GA, Bouchard C, James WPT (eds). Handbook of Obesity, New York, p 359-378, 1998.
- ALLISON DB, KAPRIO J, KORKEILA M, KOSKENVUO M, NEALE MC, et al. *The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart*. Int J Obes Relat Metab Disord, v.20, p.501-506, 1996.
- ARAUJO, G. G.; ARAÚJO, M. B.; DANGELO, R. A.; MANCHADO, F. B.; MOTA, C. S. A.; RIBEIRO, C.; MELLO, M. A. R. *Máxima Fase Estável de Lactato em Ratos Obesos de Ambos os Gêneros*. Rev Bras Med Esporte, Niterói, v.15, n.1, Jan 2009.
- ARNER, P. *Differences in Lipolysis between Human Subcutaneous and Omental Adipose Tissues*. Ann Med, v.27, p.435-438, 1995.
- ARNER, P. *Regional Differences in Protein Production by Human Adipose Tissue*. Biochem Soc Trans, v.29, p.72-75, 2001.
- BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J. P.; BORTOLUZZI, M. N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M. J. M. *The Stomach is a Source of Leptin*. Nature, v.394, p.790-793, 1998.
- BAI, Y.; ZHANG, S.; KIM, K. S.; LEE, J. K.; KIM, K. H. *Obese Gene Expression Alters the Ability of 30A5 Preadipocytes to Respond to Lipogenic Hormones*. The Journal of Biological Chemistry, v.271, p.13.939-13.942, 1996.
- BARSH, G. S.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. *Genetics of Body-Weight Regulation*. Nature, v.404, p.644-651, 2000.
- BASSUK, S. S.; MANSON, J. E. *Epidemiological Evidence for the Role of Physical Activity in Reducing Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease*. Journal of Applied Physiology, v.99, n.3, p.1193-1204, 2005.
- BECKER, C.; HAMMERLE-FICKINGER, A.; RIEDMAIER, I.; PFAFFL, M.W. *mRNA and microRNA Quality Control for RT-qPCR Analysis*. Methods, v.50, p.237-243, 2010.
- BERGMAN, R. N.; VAN CITTERS, G. W.; MITTELMAN, S. D.; DEA, M. K.; HAMILTON-WESSLER, M.; KIM, S. P.; ELLMERER, M. *Central Role of the Adipocyte in the Metabolic Syndrome*. J Investig Med, v.49, p.119-126, 2001.
- BESKE, S. D.; ALVAREZ, G. E.; BALLARD, T. P.; DAVY, K. P. *Reduced Cardiovascular Baroreflex Gain in Visceral Obesity: Implications for the Metabolic Syndrome*. Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.), v.282, p.H630-635, 2002.

- BJÖRNTORP, P. *Abdominal Obesity and the Development of Noninsulin-Dependent Diabetes mellitus*. *Diabetes Metab Rev*, v.4, p.615-622, 1989.
- BJÖRNTORP, P.; ROSMOND, R. *Visceral Obesity and Diabetes*. *Drugs*, v.58, p.75–82, 1999.
- BLAZA, S; GARROW, J. S. *Thermogenic Response to Temperature, Exercise and Food Stimuli in Lean and Obese Women, Studied by 24h Direct Calorimetry*. *British Journal of Nutrition*, v.49, p.171-180, 1983.
- BORSHEIM, E.; LONNROTH, P.; KNARDAHL, S.; JANSSON, P. A. *No Difference in the Lipolytic Response to Beta-Adrenoceptor Stimulation In Situ but a Delayed Increase in Adipose Tissue Blood Flow in Moderately Obese Compared with Lean Men in the Post Exercise Period*. *Metabolism*, v.49, p.579-87, 2000.
- BOUCHARD, C.; TREMBLAY, A.; DESPRES, J. P.; NADEAU, A.; LUPIEN, P. J.; et al. *The Response to Long-Term Overfeeding in Identical Twins*. *N Engl J Med*, v.322, p.1477-1482, 1990.
- BOWERS, R. R.; FESTUCCIA, W. T. L.; SONG, C. K.; SHI, H.; MIGLIORINI, R. H.; BARTNESS, T. J. *Sympathetic Innervation of White Adipose Tissue and Its Regulation of fat Cell Number*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 286, p.1167-1175, Jun 2004.
- BRAY, G. A. *Obesity, Fat Intake, and Chronic Disease*. In: BLOOM, F. E.; KIPHER, D. J. (eds) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York, p.1591–1608, 1995.
- BRITO, S. C.; FESTUCCIA, W. L.; KAWASHITA, N. H.; MOURA, M. F.; XAVIER, A. R.; GARÓFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. *Increased Glyceroneogenesis in Adipose Tissue from Rats Adapted to a High-Protein, Carbohydrate-Free Diet: Role of Dietary Fatty Acids*. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 55, p.84-89, 2006.
- BROUNS, F.; VAN DER VUSSE, G. J. *Utilization of Lipids during Exercise in Human Subjects: Metabolic and Dietary Constraints*. *Br J Nutr*, v.79, p.117-28, 1998.
- BUNAG, R. D.; KRIZSAN, D.; ITOH, H. *Diminished Cardiovascular Responsiveness to Vagal Stimulation in Obese Rats*. *The American Journal of Physiology*, v.259, p. R842-848, 1990.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C. T. *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*, v.55, n.4, p.611–622, 2009.
- BUNAG, R. D.; MEYER, M.; VANSSELL, N.; KERECSÉN, L. *Conscious Obese Rats Have Impaired Reflex Bradycardia and Enhanced Norepinephrine Sensitivity*. *The American Journal of Physiology*, v.271, p.R654-660, 1996.
- CARTWRIGHT, M. J.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L. *Aging in Adipocytes: Potential Impact of Inherent, Depot-Specific Mechanisms*. *Experimental Gerontology*, v. 42, p. 463-471, 2007.

- CANNON, B.; JACOBSSON, A.; REHNMARK; NEDERGAARD, J. *Signal Transduction in Brown Adipose Tissue Recruitment: Noradrenaline and Beyond*. Int J Obesity, v.20, p.S36–S42 132, 1996.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. *Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance*. Physiol Rev, v. 84, p.277–359, 2004.
- CAREY, D. G. *Abdominal Obesity*. Curr Opin Lipidol, v.9, p.35–40, 1998.
- CARPENE, C.; CHALAU, E.; LIZARBE, M.; ESTRADA, A.; MORA, C.; PALACIN, M.; ZORZANO, A.; LAFONTAN, M.; TESTAR, X. *β 3-Adrenergic Receptors are Responsible for the Adrenergic Inhibition of Insulin-Stimulated Glucose Transport in Rat Adipocytes*. Biochem. J., v.296, p.99-105, 1993.
- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JR., O. *Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas*. Arq Bras Endocrinol Metab, v.50, n.2, São Paulo, Abr. 2006.
- CINTI, S. *The Adipose Organ*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, v. 73, p.9–15, 2005.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. *Metabolic Effects of Insulin and Glucagon*. In: CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; editors. *Biochemistry*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1994. p.269-80.
- CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; MARTINS-SANTOS, M. E. S.; BOSCHINI, R. E.; GARÓFALO, M. A. R.; FESTUCCIA, W. T. L.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. *Glyceroneogenesis is Reduced and Glucose Uptake is Increased in Adipose Tissue from Cafeteria Diet-Fed Rats Independently of Tissue Sympathetic Innervation*. J Nutr, v. 136, p.2475-2480, Jun 2006.
- CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L. A.; WOOLF, E. A.; WENG, X.; ELLIS, S. J.; LAKEY, N. D.; CULPEPPER, J.; MOORE, K. J.; BREITBART, R. E.; DUYK, G. M.; TEPPER, R. I.; MORGENSTEM, J. P. *Evidence that the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor. Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice*. Cell, v.84, p.491–495, 1996.
- CHERNOGUBOVA, E.; CANNON, B.; BENGTSSON, T. *Norepinephrine Increases Glucose Transport in Brown Adipocytes Via β 3-Adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-Dependent Pathway Stimulating Conventional and Novel PKCs*. Endocrinology, v.145, p.269–280, 2004.
- CHERNOGUBOVA, E.; HUTCHINSON, D. S.; NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T. *α 1- and β 1-Adrenoceptor Signaling Fully Compensate for β 3-Adrenoceptor Deficiency in Brown Adipocyte Norepinephrine-Stimulated Glucose Uptake*. Endocrinology, v.146, p.2271–2284, 2005.
- CHUA, S. C. J. R.; CHUNG, W. K.; WU-PENG, X. S. H.; ZHANG, Y.; LIU, S.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R. L. *Phenotypes of Mouse Diabetes and Rat Fatty Due to Mutations in the OB (Leptin) Receptor*. Science, v.271 p.994–996, 1996.

- COLLINS, S.; KUHN, C.; PETRO, A.; SWICH, A.; CHRUNYK, B.; SURWIT, R. *Role of Leptin in Fat Regulation*. Nature, v.380, p.677, 1996.
- COLLINS, S.; DANIEL, K.W.; PETRO, A.E.; SURWIT, R.S. *Strain-Specific Response to β 3-Adrenergic Receptor Agonist Treatment of Diet-Induced Obesity in Mice*, Endocrinology, v.138, p.405–413, 1997.
- COMMINS, S. P.; WATSON, P. M.; PADGETT, M. A.; DUDLEY, A.; ARGYROPOULUS, G.; GETTYS, T. W. *Induction of Uncoupling Protein Expression in Brown and White Adipose Tissue by Leptin*. Endocrinology, v.140, p.292–300, 1999.
- COMUZZIE, A. G.; ALLISON, D. B. *The Search for Human Obesity Genes*. Science, v.280, p.374–1377, 1998.
- CONSIDINE, R. V.; CONSIDINE, E. L.; WILLIAMS, C. J.; NYCE, M. R.; MAGOSIN, S. A.; BAUER, T. L.; ROSATO, E. L.; COLBERG, J.; CARO, J. F. *Evidence Against Either a Premature Stop Codon or the Absence of Obese Gene mRNA in Human Obesity*. J Clin Invest, v.95, p.2986–2988, 1995.
- CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, A; STEPHENS, T. W.; NICE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L.; CARO, J. F. *Serum Immunoreactive-Leptin Concentration in Normal-Weight and Obese Humans*. N Engl J Med, v.334, p.292–295, 1996.
- COOPER, S. J.; JACKSON, A.; MORGAN, R.; CARTER, R. *Evidence for Opiate Receptor Involvement in the Consumption of High Palatability Diet in Nondeprived Rats*. Neuropeptides, v.5, n.4-6, p. 345 – 448, 1985.
- COUSIN, B.; CASTEILLA, L.; DANI, C.; MUZZIN, P.; REVELLI, J. P.; PÉNICAUD, L. *Adipose Tissue from Various Anatomical Sites are Characterized by Different Patterns of Gene Expression and Regulation*. Biochem J, v.292, p.873-876, Jan 1993a.
- COUSIN, B.; CASTEILLA, L.; LAFONTAN, M.; AMBID, L.; LANGIN, D.; PÉNICAUD, L. *Local Sympathetic Denervation of White Adipose Tissue in Rats Induces Preadipocyte Proliferation without Noticeable Changes in Metabolism*. Endocrinology, v.133, n.5, p.2255-2262, May 1993b.
- CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. *Entendendo a Gordura. Os Ácidos Graxos*. São Paulo: Manole, p.163-72, 2002.
- CUSIN, I.; ZAKRZEWSKA, K. E.; BOSS, O.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J. P.; RICQUIER, D.; JEANRENAUD, B.; ROHER-JEANRENAUD, F. *Chronic Central Leptin Infusion Enhances Insulin-Stimulated Glucose Metabolism and Favors the Expression of Uncoupling Proteins*. Diabetes, v.47, p.1014–1019, 1998.
- DEIULIIS, J. A.; LIU, L. F.; BELURY, M. A.; RIM, J. S.; SHIN, S.; LEE, K. *Beta(3)-Adrenergic Signaling Acutely Down Regulates Adipose Triglyceride Lipase in Brown Adipocytes*. Lipids, v.45, n.6, p.479-89, Jun 2010.

- DE LIMA, D. C.; SILVEIRA, S. A.; HAIBARA, A. S.; COIMBRA, C. C. *The Enhanced Hyperglycemic Response to Hemorrhage Hypotension in Obese Rats is related to an Impaired Baroreflex*. *Metab Brain Dis*, Oct 2008.
- DENTON, R. M.; TAVARE, J. M. *Mechanisms Whereby Insulin May Regulate Intracellular Events*. In: ASHCROFT, F. M.; ASHCROFT, S. J. H.; eds. *Insulin from Molecular Biology to Pathology*. Oxford: IRL Press, 1992. p.235-62.
- DE QUIROGA, G. B. *Brown Fat Thermogenesis and Exercise: Two Examples of Physiological Oxidative Stress?* [Free Radical Biology and Medicine](#), v.13, p. 325-340, Oct 1992.
- DE VOS, P.; SALADIN, R.; AUWERX, J.; STAELS, B. *Induction of Ob Gene Expression by Corticosteroids is Accompanied by Body Weight Loss and Reduced Food Intake*. *J Biol Chem*, v.270, p.15958–15961, 1995.
- DUARTE, A. C. G.O.; FONSECA, D. F.; MANZONI, M. S. J.; SOAVE, C. F.; SENE-FIORESE, M.; DÂMASO, A. R.; CHEIK, N. C. *Dieta Hiperlipídica e Capacidade Secretória de Insulina em Ratos*. *Rev. Nutr.*, Vol.19, No.3, Campinas, May/Jun 2006.
- EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O.; MELLO, M. T.; TUFIK, S.; DÂMASO, A. *Efeitos do Exercício Crônico sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta*. *Rev Bras Med Esporte*, Niterói, v.14, n.3, May 2008.
- FANTUZZI, G. *Adipose Tissue, Adipokines, and Inflammation*. *J Allergy Clin Immunol.*, v.115, n.5, p.911-9, 2005.
- FARMER, S.R. *Transcriptional Control of Adipocyte Formation*. *Cell Metab.*, v.4, p.263–273, 2006.
- FESTUCCIA, W. T. L; GUERRA-SÁ, R.; KAWASHITA, N. H.; GARÓFALO, M. A. R.; EVANGELISTA, E. A.; RODRIGUES, V.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. *Expression of Glycerokinase in Brown Adipose Tissue is Stimulated by the Sympatetic Nervous System*. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, v. 284, p.R1536-R1541, 2003a.
- FESTUCCIA, W. T. L.; KAWASHITA, N. H.; GARÓFALO, M. A. R.; BRITO, S. R. C.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. *Control of Glyceroneogenic Activity in Rat Brown Adipose Tissue*. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, v. 285, p.R177-R182, Mar 2003b.
- FESTUCCIA, W. T. LAPLANTE, M.; BERTHIAUME, M.; GÉLLINAS, Y.; DESHALES, Y. *PPAR γ Agonism Increases Rat Adipose Tissue Lipolysis, Expression of Glyceride Lípases, and the Response of Lipolysis to Hormonal Control*. *Diabetologia*, v. 49, p.2427-2436, Aug 2006.
- FESTUCCIA, W.; OZTEZCAN, S.; LAPLANTE, M.; BERTHIAUME, M.; MICHEL, S.; DOHGU, S.; DENIS, R. G.; BRITO, M. N.; BRITO, N. A.; MILLER, D. S.; BANKS, W. A.; BARTNESS, T. J.; RICHARD, D.; DESHALES, Y. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Mediated Positive Energy Balance in the Rat is Associated with Reduced Sympathetic*

Drive to Adipose Tissues and Thyroid Status. Endocrinology, v. 149, n. 5, p. 2121-2130, May 2008.

FOSTER, M. T.; BARTNESS, T. J. *Sympathetic but not Sensory Denervation Stimulates White Adipocyte Proliferation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v. 291, p.R1630–R1637, 2006.

FREYTAG, S. O.; PAIELLI, D. L.; GILBERT, J. D. *Ectopic Expression of the CCAT/Enhancer-Binding Protein a Promotes the Adipogenic Program in a Variety of Mouse Fibroblastic Cells*. Genes Dev, v.8, p.1654–1663, 1994.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; SALVADOR, J. *Leptin-Induced Lipolysis Opposes the Tonic Inhibition of Endogenous Adenosine in White Adipocytes*. The FASEB Journal, v.15, p.333-340, 2001a.

FRÜHBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, F. J.; BURRELL, M. A. *The Adipocyte: A Model for Integration of Endocrine and Metabolic Signaling in Energy Metabolism Regulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.280, p.E827-47, 2001.

FRÜHBECK, G. *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem. J., v. 393, p.7–20, 2006.

GALLAGHER, S.R.; DESJARDINS, P.R. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, v.3, 2006 (Appendix).

GÉLÖEN, A.; COLLET, A. J.; GUAY, G.; BUKOWIECKI, L. J. *β -Adrenergic Stimulation of Brown Adipocyte Proliferation*. Am J Physiol, v.254, p.C175-C182, 1988.

GESTA, S.; TSENG, Y.; KAHN, C. R. *Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source*. Cell, v. 131, p.242-256, Oct 2007.

GETTYS, T. W.; HARKNESS, P. J.; WATSON, P. M. *The Beta 3-Adrenergic Receptor Inhibits Insulin-Stimulated Leptin Secretion from Isolated Rat Adipocytes*. Endocrinology, v.137, n.9, p.4054-7, Sep 1996.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. *Exercise, Glucose Transport and Insulin Sensitivity*. Annu Rev Med, v.49, p.235-61, 1998.

GONG, D. W.; BI, S.; PRATLEY, R. E.; WEINTRAUB, B. D. *Genomic Structure and Promoter Analysis of the Human Obese Gene*. The Journal of Biological Chemistry, v.271, n.8, p.3971-3974, 1996.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. *Understanding Adipocyte Differentiation*. Physiol Rev, USA, v. 78, n. 3, p.783-809, Jul 1998.

GREGOIRE, F. M. *Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell*. Exp Biol Med, v. 226, n. 11, p. 997-1002, 2001.

GREENBERG, A. S.; EGAN, J. J.; WEK, S. A.; GARTY, N. B.; BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; LONDOS, C. *Perilipin, a Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein*

Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets. J. Biol. Chem., v.266, p.11341–11346, 1991.

GROOP, L. C. *Insulin Resistance: the Fundamental Trigger of Type 2 Diabetes.* Diabetes, obesity & metabolism, v.1, n.1, p.S1-7, 1999.

GRUNFELD, C.; ZHAO, C.; FULLER, J.; POLLOCK, A.; MOSER, A.; FRIEDMAN, J.; FEINGOLD, K. R. *Endotoxin and Cytokines Induce Expression of Leptin, the Ob Gene Product: A Role for Leptin in the Anorexia of Infection.* J Clin Invest, v.97, p.2152–2157, 1996.

GUERRA, C.; NAVARRO, P.; VALVERDE, A. M. *Brown Adipose Tissue-Specific Insulin Receptor Knockout Shows Diabetic Phenotype without Insulin Resistance.* J Clin Invest, v.108, p.1205–1213, 2001.

HALVORSEN, Y. D.; BOND, A.; SEN, A.; FRANKLIN, D. M.; LEA-CURRIE, Y. R.; SUJKOWSKI, D.; ELLIS, P. N.; WILKISON, W. O.; GIMBLE, J. M. *Thiazolidinediones and Glucocorticoids Synergistically Induce Differentiation of Human Adipose Tissue Stromal Cells: Biochemical, Cellular, and Molecular Analysis.* Metabolism, v. 50, p.407–413, 2001.

HAMILTON, B. S.; PAGLIA, D.; KWAN, A. Y. M.; DEITEL, M. *Increased Obese mRNA Expression in Omental Fat Cells from Massively Obese Humans.* Nature Med, v.1, p.953–956, 1995.

HAUNER, H.; WABITSCH, M.; PFEIFFER, E. F. *Differentiation of Adipocyte Precursor Cells from Obese and Nonobese Adult Women and From Different Adipose Tissue Sites.* Horm Metab Res, v.19, p.35-39 (suppl), 1988.

HAUNER, H.; ENTENMANN, G. *Regional Variation of Adipose Differentiation in Cultured Stromal-Vascular Cells from the Abdominal and Femoral Adipose Tissue of Obese Women.* Int J Obes, v.15, p.21-126, 1991.

HAUSMAN, D. B., DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T. J.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. *The Biology of White Adipocyte Proliferation.* Obes. Rev., v.2, p.239–254, 2001.

HEGYI, K.; FULOP, K.; KOVACS, K.; TOTH, S.; FALUS, A. *Leptin-Induced Signal Transduction Pathways.* Cell Biol Int, v.28, p.159-69, 2004.

HICKEY, M. S.; CONSIDINE, R. V.; ISRAEL, R. G.; MAHAR, T.L.; MCCAMMON, M. R.; TYNDALL, G. L.; HOUMARD, J. A.; CARO, J. F. *Leptin is Related to Body Fat Content in Male Distance Runners.* Am J Physiol., v.271 p.E938–E940, 1996.

HILL, J. O.; WYATT, H. R.; REED, G. W.; PETERS, J.C. *Obesity and the Environment: Where Do We Go From Here?* Science, v.299, p.853–855, 2003.

HIMMS-HAGEN, J. *Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Obesity.* Prog Lipid Res, v.28, p.67–115, 1989.

HIMMS-HAGEN, J. *Neural Control of Brown Adipose Tissue Thermogenesis, Hypertrophy, and Atrophy.* Front Neuroendocrinol, v.12, p.38–93, 1991.

- HIRSCH, J.; BATCHELOR, B. *Adipose Tissue Cellularity in Human Obesity*. Clin. Endocrinol. Metab., v.5, p.299–311, 1976.
- HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. *The Biology of Leptin: A Review*. J Anim Sci., v.76, p.1405-20, 1998.
- HU, E.; TONTONNOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. *Transdifferentiation of Myoblasts by the Adipogenic Transcription Factors PPAR gamma and C/EBP alpha*. Proc Natl Acad Sci, USA, v.92, p.9856–9860, 1995.
- HULVER, M. W.; HOUWARD, J. A. *Plasma Leptin and Exercise*. Sports Med, v.33, n.7, p.473-82, 2003.
- HUTCHINSON, D. S.; CHERNOGUBOVA, E.; DALLNER, O. S.; CANNON, B.; BENGTTSSON, T. *β -Adrenoceptors, But Not α -adrenoceptors, Stimulate AMP-activated Protein Kinase in Brown Adipocytes Independently of Uncoupling Protein-1*. Diabetologia, v.48, p.2386–2395, Sep 2005.
- HWA, J. J.; GHIBAUDI, L.; COMPTON, D.; FAWZI, A. B.; STRADER, C. D. *Intracerebroventricular Injection of Leptin Increases Thermogenesis and Mobilizes Fat Metabolism in Ob/Ob Mice*. Horm. Metab. Res., v.28, p.659–663, 1996.
- HWA, J. J.; FAWZI, A. B.; GRAZIANO, M. P.; GHIBAUDI, L.; WILLIAMS, P.; VAN HECK, M.; DAVIS, H.; RUDINSKI, M. SYBERTZ, E. STRADER, C. D. *Leptin Increases Energy Expenditure and Selectively Promotes Fat Metabolism in ob/ob Mice*, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v.272, p.R1204–R1209, 1997.
- JÉQUIER, E. *Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance*. Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 967, p.379–388, 2002.
- JIMENEZ-CHILLARON, J. C.; HERNANDEZ-VALENCIA, M.; LIGHTNER, A.; FAUCETTE, R. R.; REAMER, C.; et al. *Reductions in Caloric Intake and Early Postnatal Growth Prevent Glucose Intolerance and Obesity Associated with Low Birth Weight*. Diabetologia, v.49, p.1974–1984, 2006.
- KAUFMAN, L. N.; PETERSON, M. M.; SMITH, S. M. *Hypertension and Sympathetic Hyperactivity Induced in Rats by High-Fat or Glucose Diets*. Am. J. Physiol. (End. Physiol.), v.260, p. E95-100, 1991.
- KENNEDY, G. C. *The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat*. Proc R Soc Lond (Biol), v.140, p.578–592, 1953.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. *Adipose Tissue as an Endocrine Organ*. J Clin Endocrinol Metab, v.89, p.2548-56, 2004.
- KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. *Roles of PPARs in Health and Disease*. Nature, v.405, p.421–424, 2000.

- KIM, J. B.; WRIGHT, H. M.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B. M. *ADD1/SREBP1 Activates PPAR gamma through the Production of Endogenous Ligand*. Proc Natl Acad Sci, USA, v.95, p.4333–4337, 1998.
- KIM, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Secretory, *Endocrine and Autocrine/ Paracrine Function of the Adipocyte*. J Nutr, v. 130, p.3110S–3115S, 2000a.
- KIM, J. K.; GAVRILOVA, O.; CHEN, Y.; REITMAN, M. L.; SHULMAN, G. I. *Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice*. J. Biol. Chem., v.275, p.8456–8460, 2000b.
- KIMURA, M.; TATUSHI, N.; SHIOTA, T.; YASHIE, F.; YAMAUSHI, H.; SUZUKI, M.; et al. *Long-term Exercise Down Regulates Leptin Receptor mRNA in the Arcuate Nucleus*. Neuroreport, v.15, n.4, p.713-6, 2004.
- KISSEBAH, A. H.; KRAKOWER, G.R. *Regional Adiposity and Morbidity*. .Physiol Rev, v.74, p.761-811, 1994.
- KLAUS, S.; CASSARD-DOULCIER, A. M.; RICQUIER, D. *Development of Phodopus sungorus Brown Preadipocytes in Primary Cell Culture: Effect of an Atypical Beta-Adrenergic Agonist, Insulin, and Triiodothyronin on Differentiation, Mitochondrial Development, and Expression of the Uncoupling Protein UCP*. J Biol Cell, v.115,n.1783-1790, 1991.
- KLEIN, S.; COPPACK, S. W.; MOHAMED-ALI, V.; LANDT, M. *Adipose Tissue Leptin Production and Plasma Leptin Kinetics in Humans*. Diabetes, v.45, p.984 –987, 1996.
- KLINGENBERG, M. *Uncoupling Protein — A Useful Energy Dissipator*. J. Bioenerg. Biomembr., v.31, p. 419–430, 1999.
- KOVRT, W. M.; LANDT, M.; BIRGE, J. R. S. J. *Serum Leptin Levels are Reduced in Response to Exercise Training, but not Hormone Replacement Therapy, in Older Women*. J Clin Endocrinol Metab., v.81, p.3980 –3985, 1996.
- KOLACZYNSKI, J. W.; OHANNESIAN, J. P.; CONSIDINE, R. V.; MARCO, C. C.; CARO, J. F. *Response of Leptin to Short-Term and Prolonged Overfeeding in Humans*. J Clin Endocrinol Metab., v.81, p.4162-5, 1996.
- KOZAK, L. P.; NEWMAN, S.; CHAO, P. M.; MENDOZA, T.; KOZA, R. A. *The Early Nutritional Environment of Mice Determines the Capacity for Adipose Tissue Expansion by Modulating Genes of Caveolae Structure*. PLoS ONE, v.5, n.6, p.11015, 2010.
- KRAEMER, R. R.; CHU, H.; CASTRACANE, V. D. *Leptin and Exercise*. Exp Biol Med, v. 227, p.701-8, 2002.
- KREIER, F.; YILMAZ, A.; KALSBECK, A.; ROMIJN, J. A.; SAUERWEIN, H. P.; FLIERS, E; BUIJS, R. M. *Hypothesis: shifting the equilibrium from activity to food leads to autonomic unbalance and the metabolic syndrome*. Diabetes, v.52, p.2652-2656, 2003.
- KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E. *Influence of Exercise Training on Neurogenic Control of Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats*. Hypertension, v. 34, p. 720–3, 1999.

KRIEGER, E. M.; DA SILVA, G. J. J.; NEGRAO, C. E. *Effects of Exercise Training on Baroreflex Control of the Cardiovascular System*. Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 940, p. 338–47, 2001.

LAFONTAN, M. *Differential Recruitment and Differential Regulation by Physiological Amines of Fat Cell β -1, β -2 and β -3 Adrenergic Receptors Expressed in Native Fat Cells and in Transfected Cell Lines*. Cell. Signal, v.6, p.363–392, 1994.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. *Fat Cell α 2-Adrenoceptors: the Regulation of Fat Cell Function and Lipolysis*. Endocr. Rev., v.16, p.716–738, 1995a.

LAFONTAN, M.; BOUSQUET-MELOU, A.; GALITZKY, J.; BARBE, P.; CARPENE, C.; LANGIN, D.; VALET, P.; CASTAN, I.; BOULOUMIE, A.; SAULNIER-BLACHE, J. S. *Adrenergic Receptors and Fat Cells: Differential Recruitment by Physiological Amines and Homologous Regulation*. Obesity Res., v.3, p.507S–514S, 1995b.

LAPLANTE, M.; FESTUCCIA, W. T.; SOUCY, G.; GÉLINAS, Y.; LALONDE, J.; BERGER, J.P.; DESHAIES, Y. *Mechanisms of the Depot Specificity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Action on Adipose Tissue Metabolism*. Diabetes, v. 56, p. 2771-2778, Oct 2006.

LEE, M. O. *Determination of the Surface Area of the White Rat with Its Application to the Expression of Metabolic Results*. Am. J. Physiol., v.89, p.24-33, 1929.

LEME, J. A. C. A.; MANCHADO-GOBATTO, R. F. S. F. B.; ALMEIDA JR., C. C.; MELLO M. A. R.; LUCIANO, E. *Efeitos do Exercício Físico e do Tratamento com Metformina Sobre os Aspectos Endócrino-Metabólicos de Ratos Obesos de Ambos os Sexos*. Rev Bras Med Esporte, v.8, 2008.

LEROY, P.; DESSOLIN, S.; VILLAGEOIS, P.; MOON, B.C.; FRIEDMAN, J.M.; AILHAUD, G.; DANI, C. *Expression of ob gene in Adipose Cells. Regulation by Insulin*. The Journal of Biological Chemistry, v.271, n.5, p.2.365-2.368, 1996.

LEVIN, B. E. *Intracarotid Glucose Induced Norepinephrine Response and the development of Diet Induced Obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, v.6, n.16, p.451-7, Jun 1992.

LEVINE, J. A.; EBERHARDT, N. L.; JENSEN, M. D. *Role of Nonexercise Activity Thermogenesis in Resistance to Fat Gain in Humans*. Science, v. 283, p.212–214, 1999.

LI, H.; MATHENY, M.; NICOLSON, M.; TÜMER, N.; SCARPACE, P. J. *Leptin Gene Expression Increases with Age Independent of Increasing Adiposity in Rats*. Diabetes, v.46, p.2035–2039, 1997.

LIU, X.; PERUSSE, F.; BUKOWIECKI, L. J. *Chronic Norepinephrine Infusion Stimulates Glucose Uptake in White and Brown Adipose Tissues*. Am J Physiol, v.266, p.R914–R920, 1994.

LIU, X.; PERUSSE, F.; BUKOWIECKI, L. J. *Mechanisms of the Antidiabetic Effects of the β 3-Adrenergic Agonist CL-316243 in Obese Zucker-ZDF Rats*. Am J Physiol, v.274, p.R1212–R1219 2393, 1998.

- LLADÓ, I.; PROENZA, A. M.; SERRA, F.; PALOU, A.; PONS, A. *Dietary-Induced Permanent Changes in Brown and White Adipose Tissue Composition in Rats*. Int J Obes, v.15, p.415–419, 1991.
- LÖNNQUIST, F.; ARNER, P.; NORDFORS, L.; SCHALLING, M. *Overexpression of the Obese (ob) Gene in Adipose Tissue of Human Obese Subjects*. Nature Med, v.1, p.950–953, 1995.
- LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. *Towards a Molecular Understanding of Adaptive Thermogenesis*. Nature, v.404, p.652–660, 2000.
- MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; KERN, P. A.; FRIEDMAN, J. M. *Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Leptin and ob mRNA in Obese and Weight Reduced Subjects*. Nature Med, v.1, p.1155–1161, 1995.
- MAFFEI, M.; STOFFEL, M.; BARONE, M.; MOON, B.; DAMMERMAN, M.; RAVUSSIN, E.; BOGARDUS, C.; LUDWIG, D. S.; FLIER, J. S.; TALLEY, M.; AUERBAG, S.; FRIEDMAN, J. M. *Absence of Mutations in the Human ob Gene in Obese/Diabetic Subjects*. Diabetes, v.45, p.679–682, 1996.
- MANCHESTER, K.L. *Biotechniques*, v. 20, p.968–970, 1996.
- MARETTE, A.; BUKOWIECKI, L. J. *Stimulation of Glucose Transport by Insulin and Norepinephrine in Isolated Rat Brown Adipocytes*. Am J Physiol, v.257, p.C714–C721, 1989.
- MATTISON, R.; JESEN, M. *The Adipocyte as an Endocrine Cell*. Curr Opin Endocrinol Diab, v.10, p.317–21, 2003.
- McCANCE, R. A. *Food, Growth, and Time*. Lancet, v.2, p.671–676, 1962.
- MIGLIORINI, R. H.; GAROFALO, M. A.; KETTELHUT, I. C. *Increased Sympathetic Activity in Rat White Adipose Tissue during Prolonged Fasting*. Am J Physiol, v. 272, p.R656–R661, 1997.
- MILLET, L.; VIDAL, H.; ANDRIELLI, F.; LARROUY, D.; RION, J. P.; RICQUIER, D.; *et al.* *Increased Uncoupling Protein-2 and-3 mRNA Expression During Fasting in Obese and Lean Humans*. J Clin Invest., v.100, n.11, p.2665–70, 1997.
- MIRANDA, M.; ESCOTÉ, X.; ALCAIDE, M. J.; SOLANO, E.; CEPERUELO-MALLAFRÉ, V.; HERNÁNDEZ, P.; WABITSCH, M.; VENDRELL, J. *Lpin1 in Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue: Similar Levels but Different Associations with Lipogenic and Lipolytic Genes*. Am J Physiol Endocrinol Metab., v.299, n.2, p.E308–17, Aug 2010.
- MISRA, A.; VIKRAM, N. K. *Clinical and Pathophysiological Consequences of Abdominal Adiposity and Abdominal Adipose Tissue Depots*. Nutrition, v.19, p.457–466, 2003.
- MIYAZAKI, S.; IZAWA, T.; OGASAWARA, J.; SAKURAI, T.; NOMURA, S. ; KIZAKI, T.; OHNO, H.; KOMABAYASHI, T. *Effect of Exercise Training on Adipocyte-Size-Dependent Expression of Leptin and Adiponectin*. Life Sciences, v.86, p.691–698, 2010.

- MORRISON, R. F.; FARMER, S. R. *Insights into the Transcriptional Control of Adipocyte Differentiation*. J Cell Biochem, v.32/33, p.59–67, 1999.
- MORRISON, R. F.; FARMER, S. R. *Hormonal Signaling and Transcriptional Control of Adipocyte Differentiation*. J Nutr, v. 130, p.3116S–3121S, 2000.
- MORRISON C, D.; HUYPENS, P.; STEWART, L. K.; GETTYS, T. W. *Implications of Crosstalk Between Leptin and Insulin Signaling During the Development of Diet-Induced Obesity*. Biochimica et Biophysica Acta, v.1792, p.409–416, 2009.
- MÜELLER, P. J. *Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v.34, p. 377-384, 2007.
- MURAKAMI, T., IIDA, M., SHIMA, K. *Dexamethasone Regulates Obese Expression in Isolated Rat Adipocytes*. Biochemical and Biophysical Research communications, v.214, n.3, p.1260-1267, 1995.
- MUSRI, M. M.; GOMIS, R.; PARRIZAS, M. *A Chromatin Perspective of Adipogenesis*. Organogenesis, v.6, n.1, p.15-23, Mar 2010.
- MYERS, M.G.; COWLEY, M.A.; MUNZBERG, H. *Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance*, Annu. Rev. Physiol., v.70, p.537–556, 2008.
- NEGRAO, C. E.; IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P. C.; FREIRE, P. M.; KRIEGER, E. M. *Effect of Exercise Training on RSNA, Baroreflex Control, and Blood Pressure Responsiveness*. Am. J. Physiol, v. 265, p. R365–70, 1993.
- NETTO, E. S. *Atividade Física para Diabéticos*. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.
- NICHOLLS, D. G.; LOCKE, R. M. *Thermogenic Mechanisms in Brown Fat*. Physiol Rev, v.64, p.1–84, 1984.
- OBERKOFER, H.; LIU, Y. M.; ESTERBAUER, H.; HELL, E.; KREMPLER, F.; PATSCH, W. *Uncoupling Protein-2 Gene: Reduced mRNA Expression in Intraperitoneal Adipose Tissue of Obese Human*. Diabetologia, v.41, n.8, p.940-6, 1998.
- O'DONOVAN, G.; KEARNEY, E. M.; NEVILL, A. M.; WOOLF-MAY, K.; BIRD, S. R. *The Effects of 24 Weeks of Moderate- or High-Intensity Exercise on Insulin Resistance*. European Journal of Applied Physiology, v.95, n.5-6, p.522-528, 2005.
- OZANNE, S. E.; HALES, C. N. *Lifespan: Catch-Up Growth and Obesity in Male Mice*. Nature, v.427, p.411–412, 2004.
- PAGLIASSOTTI, M. J.; PRACH, P. A.; KOPPENHAFFER, T. A.; PAN, D. A. *Changes in Insulin Action, Triglycerides, and Lipid Composition During Sucrose Feeding in Rats*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v.271, p.R1319–R1326, 1996.
- PALOU, A.; PICÓ, C.; BONET, M. L.; OLIVER, P. *Molecules in Focus. The Uncoupling Protein Thermogenin*. Int J Biochem Cell Biol, v.30, p.7–11, 1998.

- PALOU, A.; SERRA, F.; BONET, M. L.; PICÓ, C. *Obesity: Molecular Bases of a Multifactorial Problem*. Eur J Nutr, v.39, p.127–144, 2000.
- PÉRUSSE, L.; COLLIER, G.; GAGNON, J.; LEON, A. S.; RAO, D. C.; SKINNER, J. S.; WILMORE, J. H.; NADEAU, A.; ZIMMET, P. Z.; BOUCHARD, C. *Acute and Chronic Effects of Exercise on Leptin Levels in Humans*. J Appl Physiol, v.83, p.5-10, 1997.
- PETTERSON P.; VAN, R.; KARLSSON, M.; BJÖRNTORP, P. *Adipocyte Precursor Cells in Obese and Nonobese Humans*. Metabolism, v.34, p.808-812, 1985.
- PICÓ, C.; PONS, A.; GIANOTTI, M.; PALOU, A. *Sustained Changes in Blood Alpha Amino Nitrogen Compartmentation During Recovery from Cafeteria Feeding in Rats*. Arch Int Physiol Biochim Biophys, v.99, p.345–348, 1991.
- POLLOCK, M. L.; WILMORE, J. H. *Exercícios na Saúde e na Doença*. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 1993.
- POND, C. *Ecology of Storage and Allocation of Resources: Animals*. Encyclopedia of Life Sciences, p.1-5, 2001.
- PRAZERES, F. G.; PESSOA, D. C. N. P.; BION, F. M.; ARNAULD, T. M. S. *Exercício Físico, Crescimento e Desenvolvimento: Estudo em Ratos Jovens Desnutridos pela Dieta Básica Regional (DBR) e Recuperados Nutricionalmente CDD*. Rev. Bras. Educ. Fís. Esp., São Paulo, v.18, n.1, p.7-16, Jan 2004.
- PRINS, J.B.; O'RAHILLY, S. *Regulation of Adipose Cell Number in Man*. Clin. Sci., London, v.92, p.3–11, 1997.
- PROENZA, A.; LLADÓ, I.; SERRA, F.; PICÓ, C.; PONS, A.; PALOU, A. *Tissue Composition in Persistent Dietary Obesity after Early and Adulthood Overfeeding In The Rat*. Arch Int Physiol Biochim Biophys, v.100, n.147–154, 1992.
- PROKESH, A.; HACKL, H.; WEBER, R. H.; BORNSTEIN, S. R.; TRAJANOSKI, Z. *Novel Insights into Adipogenesis from Omic Data*. Current Medicinal Chemistry, v.16, p.2952-2964, 2009.
- PUIGSERVER, P.; LLADÓ, I.; PALOU, A.; GIANOTTI, M. *Evidence for Masking of Brown Adipose Tissue Mitochondrial GDP-Binding Sites in Response to Fasting in Rats Made Obese by Dietary Manipulation*. Biochem J, v.279, p.575–579, 1991.
- PUIGSERVER, P.; GIANOTTI, M.; PALOU, A. *Impaired Starvation-Induced Loss of Mitochondrial Protein in the Brown Adipose Tissue of Dietary Obese Rats*. Int J Obes, v.16, p.255–261, 1992.
- PUIGSERVER, P.; NADAL-GINARD, B.; PALOU, A. *Expression and Interaction of C/EBP Alpha Adipogenic Transcription Factor and Retinoblastoma Protein in Adipocytes During Differentiation*. Int J Obes, v.18, S2, p.113, 1994.

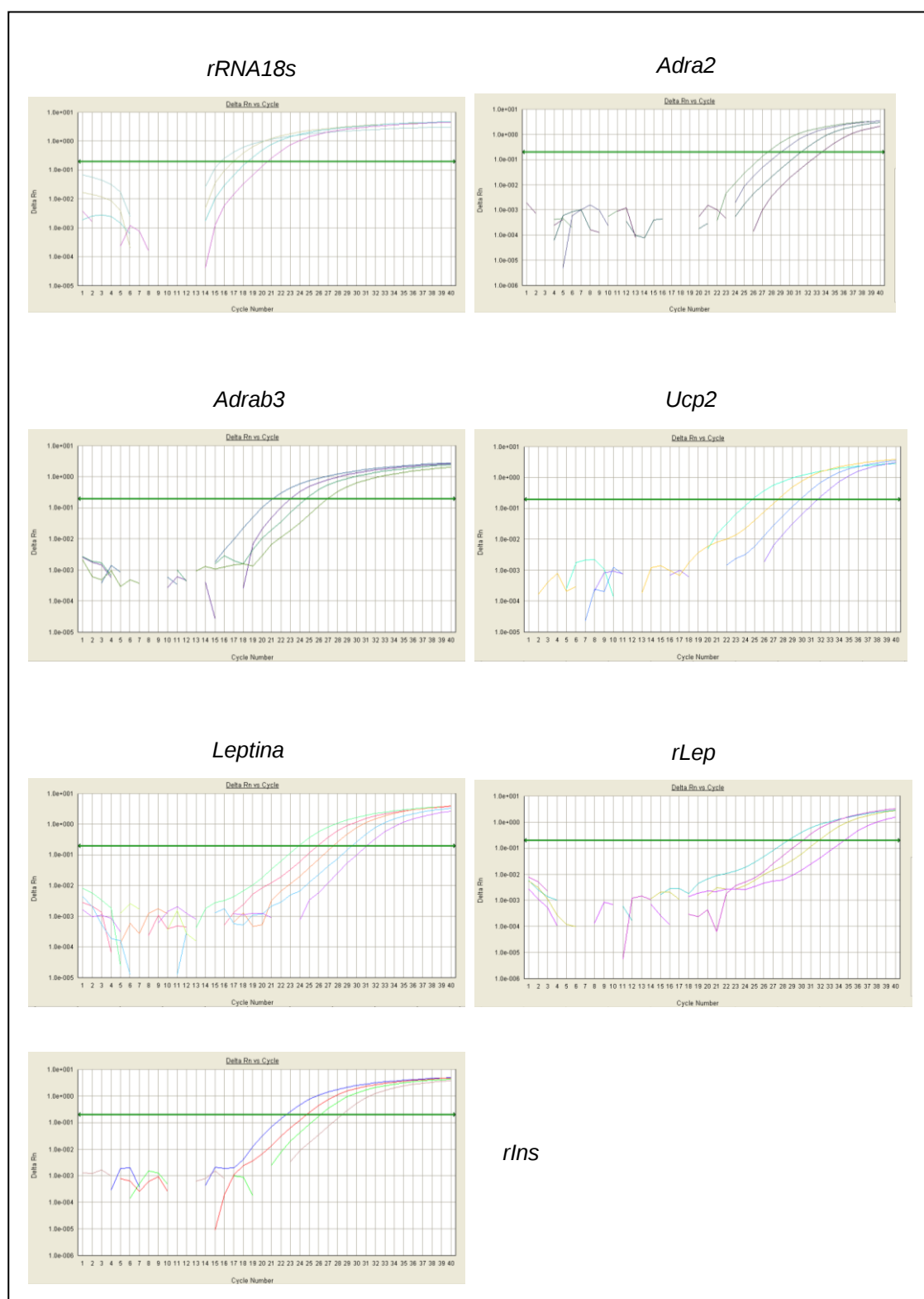
- PUIGSERVER, P.; PICÓ, C.; STOCK, M. J.; PALOU, A. *Effect of Selective β -Adrenoceptor Stimulation on UCP Synthesis in Primary Cultures of Brown Adipocytes*. Mol Cell Endocrinol, v.117, p.7–16, 1996.
- PUIGSERVER, P.; WU, Z.; PARK, C. W.; GRAVES, R.; WRIGHT, M.; SPIEGELMAN, B. M. *A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis*. Cell, v.92, p.829–839, 1998.
- RACETTE, S. B.; COPPACK, S. W.; LANDT, M.; KLEIN, S. *Leptin Production during Moderate-Intensity Aerobic Exercise*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism v.82, n.7, 1997.
- RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. *Minireview: The Adipocyte – At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis*. Endocrinology, v.144, p.3765-73, 2003.
- RASOULI, N.; MOLAVI, B.; ELBEIN, S. C.; KERN, P. A. *Ectopic Fat Accumulation and Metabolic Syndrome*, Diabetes Obes. Metab., v.9, p.1–10, 2007.
- REHNMARK, S.; NÉCHAD, M.; HERRON, D.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. *α and β -Adrenergic Induction of the Expression of the Uncoupling Protein Thermogenin in Brown Adipocytes Differentiated in Culture*. J Biol Chem, v.265, p.16464-16471, 1990.
- ROCA, P.; RODRIGUEZ, A. M.; OLIVER, P.; BONET, M. L.; QUEVEDO, S.; PICÓ, C.; PALOU, A. *Brown Adipose Tissue Response to Cafeteria Diet-Feeding Involves Induction of the UCP2 Gene and is Impaired in Female Rats as Compared to Males*. Pflügers Arch (Eur J Physiol), v.438, p.628–634, 1999.
- ROURU, J.; CUSIN, I.; ZAKRZEWSKA, K. E.; JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F. *Effects of Intravenously Infused Leptin on Insulin Sensitivity and on the Expression of Uncoupling Proteins in Brown Adipose Tissue*. Endocrinology, v.140, p.3688–3692, 1999.
- ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; *A Role for Brown Adipose Tissue in Diet Induced Thermogenesis*. Nature, v.281, p.31–35, 1979.
- RUBY, B. C.; ROBERGS, R. A. *Gender Differences in Substrate Utilization during Exercise*. Sports Med, v.17, p.393-410, 1994.
- SALADIN, R.; DE VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAELS, B.; AUWERX, J. *Transient Increase in Obese Gene Expression After Food Intake or Insulin Administration*. Nature, v.377, p.527–529, 1995.
- SCARPACE, P. J.; MATHENY, M.; POLLOCK, B. H.; TYMER, N. *Leptin Increases Uncoupling Protein Expression and Energy Expenditure*. Am J Physiol, v.273, p.E226–E230, 1997.
- SCARPACE, P. J.; NICOLSON, M.; MATHENY, M. *UCP2, UCP3 and Leptin Gene Expression: Modulation by Food Restriction and Leptin*. J Endocrinol, v.159, p.349–357, 1998.

- SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, J. R. D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. *Central Nervous System Control of Food Intake*. *Nature*, v.404, p.661–71, 2000.
- SEALE, P.; KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M. *Transcriptional Control of Brown Adipocyte Development and Physiological Function — Of Mice and Men*. *Genes & Development*, v.23, p.788–797, 2009.
- SELL, H.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. *The Brown Adipocyte: Update on Its Metabolic Role*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.36, p.2098–2104, 2004.
- SEN, A.; LEA-CURRIE, Y. R.; SUJKOWSKA, D.; FRANKLIN, D. M.; WILKISON, W. O.; HALVORSEN, Y. D.; GIMBLE, J. M. *Adipogenic Potential of Human Adipose Derived Stromal Cells from Multiple Donors is Heterogeneous*. *J Cell Biochem*, v. 81, p.312–319, 2001.
- SHAHPARAKI, A.; GRUNDER, L.; SORISKY, A. *Comparison of Human Abdominal Subcutaneous versus Omental Preadipocyte Differentiation in Primary Culture*. *Metabolism*, v.51, p.1211-1215, 2002.
- SHERMAN, L. A.; HIRSHMAN, M. F.; CORMONT, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GOODYEAR, L. J. *Differential Effects of Insulin and Exercise on Rab4 Distribution in Rat Skeletal Muscle*. *Endocrinology*, v.137, p.266-73, 1996.
- SHIMIZU, Y.; NIKAMI, H.; SAITO, M. *Sympathetic Activation of Glucose Utilization in Brown Adipose Tissue in Rats*. *J Biochem, Tokyo*, v.110, p.688–692, 1991.
- SIEGRIST-KAISER, C.; PAULI, V.; JUGE-AUBRY, C.; BOSS, O.; PERNIN, A.; CHIN, W. W.; CUSIN, I.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; BURGER, A. G.; ZAPF, J.; MEIER, C. A. *Direct Effects of Leptin on Brown and White Adipose Tissue*. *J Clin Invest*, v.100, p.2858–64, 1997.
- SILVA, J. E. *Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation*. *Physiol Rev*, v. 86, p.435–464, 2006.
- SINDELAR, D. K.; HAVEL, P. J.; SEELEY, R. J.; WILKINSON, C. W.; WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W. *Low Plasma Leptin Levels Contribute to Diabetic Hyperphagia in Rats*. *Diabetes*, v.48, p.1275–1280, 1999.
- SINHA, M. K.; OHANNESIAN, J. P.; HEIMAN, M. L., et al. *Nocturnal Rise in Leptin in Lean, Obese, and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Subjects*. *J Clin Invest.*, v.97, p.1344 – 1347, 1996.
- SLIEKER, L.J., SLOOP, K.W., SURFACE, P.L., KRIAUCIUNAS, A., LAQUIER, F., MANETTA, J., BUE-VALLESKEY, J., STEPHENS, T.W. *Regulation of Expression of ob mRNA and Protein by Glucocorticoids and cAMP*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.10, p.5301-5304, 1996.
- SMITH, C. J.; VASTA, V.; DEGERMAN, E.; BELFRAGE, P.; MANGANIELLO, V. C. *Hormone-Sensitive Cyclic GMP-Inhibited Cyclic AMP Phosphodiesterase in Rat Adipocytes. Regulation of Insulin- and cAMP-Dependent Activation by Phosphorylation*. *J Biol Chem*, v. 266, p.13385-90, 1991.

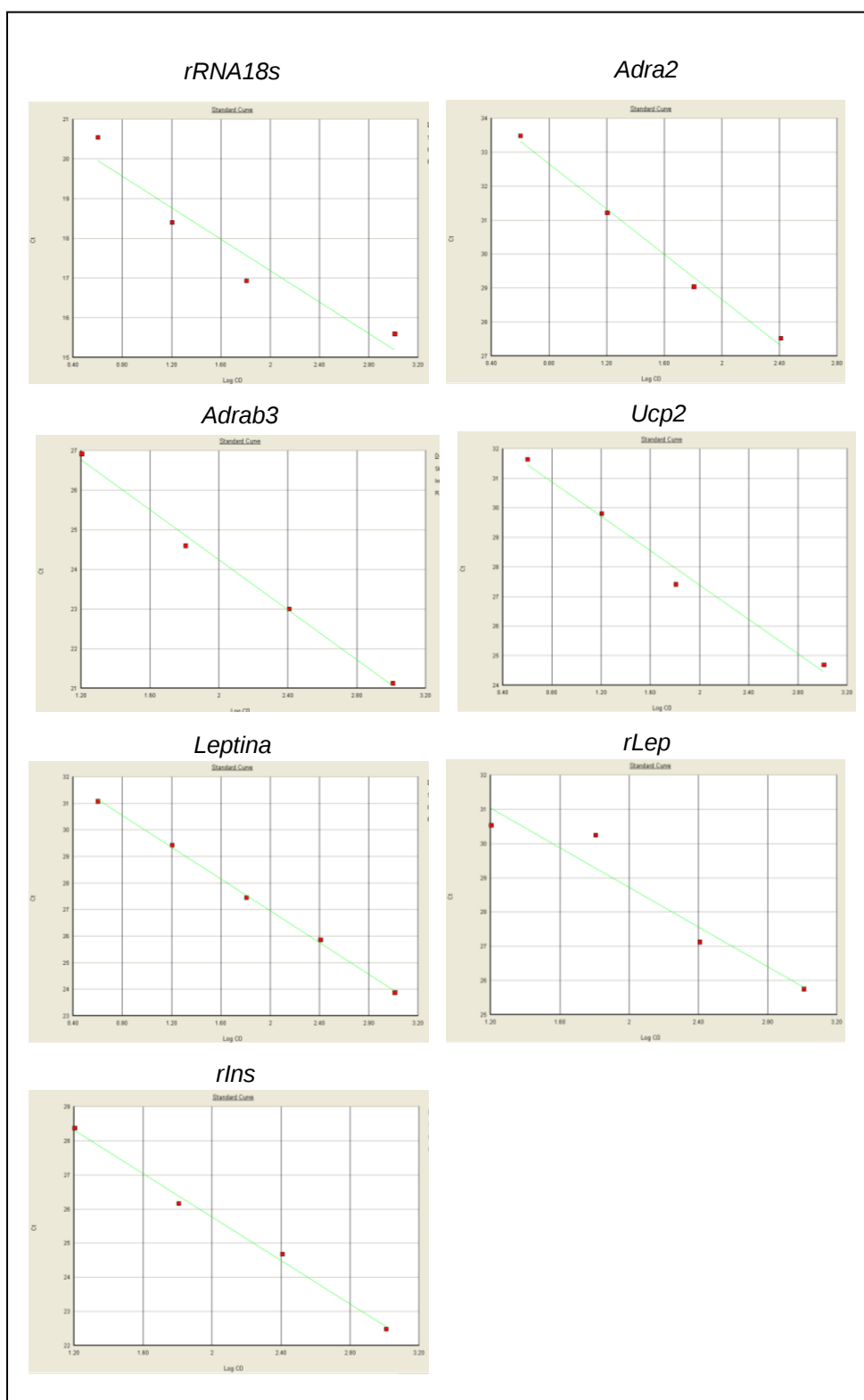
- SOUSA, M.; BRÁS-SILVA, C.; LEITE-MOREIRA, A. *O Papel da Leptina na Regulação da Homeostasia Energética*. Acta Med Port, v.22, p. 291-298, 2009.
- SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. *Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Picture*. Cell, v.87, p.377–389, 1996.
- SUSULIC, V. S.; LOWELL, B. B. *Brown Adipose Tissue and the Regulation of Body Fat Stores*. Curr Opin Endocrinol Diabetes, v.3, p.44–50, 1995.
- SUZUKI, S.; SEMBON, S.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; ONISHI, A. *Identification of Genes Down Regulated during Differentiation of Porcine Mesenteric Adipocytes*. J. Anim. Sci., v.86, p.3367–3376, 2008.
- SMAS, C. M.; SUL, H. S. *Control of Adipocyte Differentiation*. Biochem J, v.309, p.697–710, 1995.
- SWEENEY, G. *Leptin signalling. Review article*. Cell Signal, v.14, p.655-63, 2002.
- TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOLF, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. *Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R*. Cell, v.83, p.1263–1271, 1995.
- TCHOUKALOVA, Y.D.; SARR, M. G.; JENSEN, M. D. *Measuring Committed Preadipocytes in Human Adipose Tissue from Severely Obese Patients by Using Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.287, p.R1132–R1140, 2004.
- TERAN-GARCIA, M.; RANKINEN, T.; KOZA, R. A.; RAO, D. C.; BOUCHARD, C. *Endurance Training-Induced Changes in Insulin Sensitivity and Gene Expression*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v.288, n.6, p.E1168-78, 2005.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. *Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR gamma 2, a Lipid Activated Transcription Factor*. Cell, v.79, p.1147–1156, 1994.
- TRAYHURN, P.; DUCAN, J. S.; RAYNER, D. V.; HARDIE, L. J. *Rapid Inhibition of Ob Gene Expression and Circulating Leptin Levels in Lean Mice by the β 3-Adrenoceptor Agonists BRL35135A and ZD2079*. Biochem Biophys Res Commun, v.228, p.605–610, 1996.
- VAN HARMELEN, V.; DICKER, A.; RYDEN, M.; HAUNER, H.; LONNQVIST, F.; NASLUND, E.; ARNER, P. *Increased Lipolysis and Decreased Leptin Production by Human Omental as Compared with Subcutaneous Preadipocytes*. Diabetes, v. 51, p.2029–2036, 2002.
- VAN HARMELEN, V.; RÖHRIG, K.; HAUNER, H. *Comparison of Proliferation and Differentiation Capacity of Human Adipocyte Precursor Cells from the Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Depot of Obese Subjects*. Metabolism, v. 53, n.5, p. 632-637, May 2004.
- WABITSCH, M.; BRENNER, R. E.; MELZNER, I.; BRAUN, M.; MOLLER, P.; HEINZE, E.; DEBATIN, K. M.; HAUNER, H. *Characterization of a Human Preadipocyte Cell Strain with*

- High Capacity for Adipose Differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, v. 25, p.8–15, 2001.
- WAGONER, B.; HAUSMAN, D. B.; HARRIS, R. B. S. *Direct and Indirect Effects of Leptin on Preadipocyte Proliferation and Differentiation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.290, p.R1557–R1564, 2006.
- WAJCHENBERG, B. L. *Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome*. Endocr Rev, v. 21, p.697–738, 2000.
- WANG, M. Y.; LEE, Y.; UNGER, R. H. *Novel Forms of Lipolysis Induced by Leptin*. J Biol Chem, v.274, p.17541–17544, 1999.
- WANG, J. L.; CHINOOKOSWONG, N.; SCULLY, S.; QI, M.; SHI, Z. Q. *Differential Effects of Leptin in Regulation of Tissue Glucose Utilization In Vivo*. Endocrinology, v.140, n.5, p.2117–24, 1999.
- WOLF, G. *Brown Adipose Tissue: the Molecular Mechanism of Its Formation*. Nutrition Reviews, v.67, n.3, p.167–171, 2009.
- WOODS, S.; SEELEY, R.; PORTE, D. J.; SCHWARTZ, M. *Signals that Regulate Food Intake and Energy Homeostasis*. Science, v.280, p.1378–1383, 1998.
- WU, Z.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. *Transcriptional Activation of Adipogenesis*. Curr Opin Cell Biol, v.11, p.689–694. 1999.
- YU, C.; CHEN, Y.; CLINE, G. W.; ZHANG, D.; ZONG, H.; WANG, Y.; BERGERON, R.; KIM, J. K.; CUSHMAN, S. W.; COONEY, G. J.; ATCHESON, B.; WHITE, M. F.; KRAEGEN, E. W.; SHULMAN, G. I. *Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle*. J. Biol. Chem., v.277, p.50230–50236, 2002.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN JM. *Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue*. Nature, v.1, n.372 (6505), p.425–32, Dec 1994.
- ZHAO, J.; UNELIUS, L.; BENGTSSON, T.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. *Coexisting β -Adrenoceptor Subtypes: Significance for the Thermogenic Process in Brown Fat Cells*. Am J Physiol, v.267, p.C969–C979, 1994.
- ZHOU, Y. T.; SHIMABUKURO, M.; KOYAMA, K.; LEE, Y.; WANG, M. Y.; TRIEU, F.; NEWGARD, C. B.; UNGER, R. H. *Induction by Leptin of Uncoupling Protein-2 and Enzymes of Fatty Acid Oxidation*. Proc Natl Acad Sci, USA, v.94, p.6386–6390, 1997.

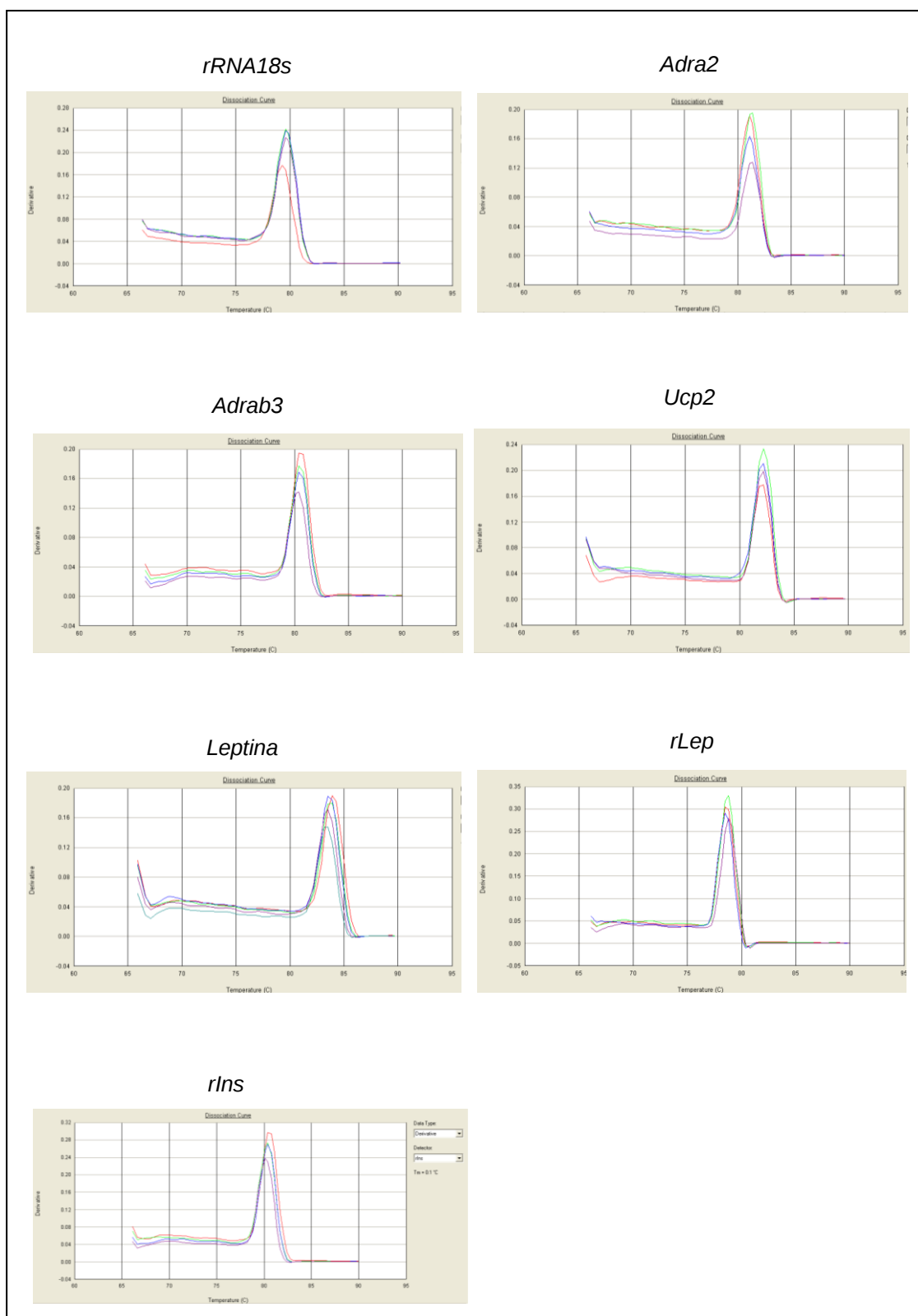
IX ANEXOS



Anexo 01: Gráfico de amplificação referente às curvas de eficiência dos genes *rRNA18S*, *Adra2*, *Adrb3*, *Ucp2*, *Leptina*, *rLep* e *rIns* utilizando diluição seriada de 4x de cDNA de TAM e TAB. Em X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e em Y os valor de ΔRn . As intercessões da linha verde com as curvas indicam o Cq da curva de amplificação.



Anexo 02: Curvas padrão referentes aos genes *rRNA18S*, *Adra2*, *Adrb3*, *Ucp2*, *Leptina*, *rLep* e *rlns* utilizando diluição seriada de 4x de cDNA de TAM e TAB. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e em Y os valores de C_q correspondes a cada diluição.



Anexo 03: Curvas de dissociação referentes aos amplicons dos primers *rRNA18S*, *Adra2*, *Adrab3*, *Ucp2*, *Leptina*, *rLep* e *rlns*. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do amplicon gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.

CS (4 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1A	326,96	3,193	5,581	0,4435	0,3204	4,1531	3,936	1,313	0,8165
2A	293	1,693	3,834	0,3689	0,3118	2,8850	4,134	2,033	0,4705
7	328	1,678	3,512	0,2933	0,3466	2,5100	-	-	-
3A	308,1	1,1045	2,8965	0,417	0,3127	1,9944	2,657	1,07	0,6575
4A	288	1,25	3,165	0,4016	0,3206	2,3696	3,7	0,218	0,7155
5A	288,35	2,509	5,063	0,612	0,3477	4,0141	4,331	0,821	0,887
6A	254,09	0,942	2,366	0,336	0,3136	2,2149	4,505	1,059	1,0715
7A	223,15	1,19	3,199	0,413	0,2944	3,2189	4,273	1,482	1,343
8A	283,3	1,812	4,35	0,407	0,3457	3,0860	3,238	1,546	0,7075
9A	287,6	1,392	3,82	0,69	0,3456	2,8553	6,157	1,391	0,5205
10A	271,8	1,32	2,95	0,228	0,3322	2,6904	3,957	1,255	0,6685
11A	278,3	0,65	1,984	0,425	0,3037	1,6692	3,551	0,687	0,58
12A	351	2,117	5,833	0,689	0,3281	3,2207	-	-	0,9055
n	13	13	13	13	13	13	11	11	12
Média	290,8961538	1,603884615	3,734884615	0,440330769	0,324853846	2,83705	4,039909091	1,170454545	0,778625
SD	33,09225049	0,688231313	1,186365215	0,141562262	0,017752775	0,72359	0,881705104	0,484119482	0,24687788
EPM	1,766333659	0,473014004	0,4912159	0,170544564	0,030992966	0,20069	0,265844092	0,145967516	0,071267505

Anexo 04: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais CS de 4 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a letra “A” seguinte ao número representa o grupo de 4 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

DS (4 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1A	317,3	3,794	5,923	0,7136	0,3248	4,9271	4,96	3,538	1,433
2A	399	4,509	7,445	0,7762	0,3393	4,3738	6,80	1,384	1,8385
7	212	1	2,394	0,3853	0,2981	2,6830	-	-	-
3A	255,1	1,282	3,383	0,517	0,2936	2,7589	6,98	2,895	1,1935
4A	328,67	4,27	4,17	0,7975	0,3173	4,6411	3,00	0,111	1,349
5A	302,5	1,847	3,148	0,512	0,3093	2,7273	7,97	0,802	1,4375
6A	270,27	1,461	2,647	0,669	0,3514	2,6823	4,21	1,089	1,152
7A	321,88	3,707	6,828	0,701	0,3144	4,8626	5,05	0,662	1,093
8A	325,4	3,279	5,543	0,724	0,3339	4,0900	6,52	4,343	0,7765
9A	324,6	2,131	6,153	0,899	0,3242	4,5936	5,50	1,731	0,5905
10A	289	2,027	5,214	0,357	0,3306	3,5519	7,96	1,378	0,438
11A	238,2	0,769	1,763	0,518	0,3099	1,8353	6,19	1,186	1,1155
12A	286,5	2,825	4,195	0,412	0,3296	3,8232	-	-	-
n	13	13	13	13	13	13	11	11	11
Média	297,7246154	2,530846154	4,523538462	0,613969231	0,321261538	3,6577	5,921	1,738090909	1,128818182
SD	47,74640503	1,277891091	1,804575694	0,173686962	0,016350053	1,02227	1,551448356	1,304858035	0,404631331
EPM	13,24247012	0,35442322	0,500499246	0,048172096	0,004534689	0,28353	0,46777928	0,393429501	0,122000937

Anexo 05: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais DS de 4 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a letra “A” seguinte ao número representa o grupo de 4 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING - inguinal; IA - índice de adiposidade; SD - desvio padrão; EPM - erro padrão da média.

CTE (4 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1A	279,3	1,347	1,527		0,3422	1,8458	2,62	0,565	1,2135
2A	274,3	7,92	7,94	0,2935	0,3079	9,8402	2,04	1,196	1,2975
3A	276,2	1,171	2,469	0,274	0,3072	2,0231	2,95	0,588	1,8645
4A	269,02	1,16	2,11	0,276	0,3031	2,0623	3,45	0,648	1,753
5A	237,9	0,525	1,989	0,318	0,3261	1,7375	2,53	0,861	1,1525
6A	195,4	0,307	0,985	0,326	0,3154	1,1995	2,66	0,652	0,64
7A	175,33	0,577	1,64	0,346	0,3058	2,1784	2,79	0,883	0,6985
8A	262,9	1,597	4,308	0,387	0,3372	3,5068	2,65	0,771	0,7475
9A	252,8	0,992	1,865	0,278	0,3243	1,7361	1,82	0,407	0,558
10A	295,2	1,083	3,002	0,319	0,3171	2,1503	2,00	0,64	0,4415
11A	285,2	0,551	2,374	0,314	0,2992	1,7863	-	-	-
12A	321,2	2,188	4,156	0,427	0,3215	3,1809	4,3	0,893	1,306
n	12	12	12	11	12	12	11	11	11
Média	260,3958333	1,618166667	2,86375	0,3235	0,31725	2,7706	2,708727273	0,736727273	1,061136364
SD	40,93148276	2,052430924	1,884961351	0,048035924	0,013536449	2,31429	0,701991608	0,214033685	0,481225576
EPM	11,8159013	0,592485773	0,544141472	0,014483376	0,003907636	0,66808	0,211658434	0,064533584	0,14509497

Anexo 06: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais CTE de 4 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a letra “A” seguinte ao número representa o grupo de 4 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

DTE (4 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1A	304,23	3,815	6,184	0,799	0,3313	5,3950	2,66	1,76	0,8975
2A	304	8,06	7,85	0,5437	0,3264	8,8664	3,41	1,304	2,0535
3A	325,46	4,951	8,827	0,44	0,3199	6,2605	7,56	0,66	0,9745
4A	248	1,184	2,88	0,4663	0,3239	2,7448	4,77	0,776	1,4985
5A	300,15	2,358	5,008	0,52	0,3451	3,7680	5,22	0,876	1,281
6A	228	1,157	1,362	0,228	0,2966	1,9482	4,24	0,609	1,324
7A	304,63	4,822	7,248	0,533	0,3486	6,3370	5,27	0,669	0,928
8A	340,2	2,498	5,083	0,718	0,3075	3,5837	3,97	0,888	0,571
9A	249,5	2,17	3,323	0,49	0,3313	3,4673	3,87	1,415	0,476
10A	333,7	3,816	5,364	0,921	0,3153	4,5655	5,43	1,808	0,7655
11A	223,2	0,936	2,315	0,494	0,3111	2,2788	5,48	0,872	0,7705
12A	285	2,167	5,28	0,492	0,3410	4,1099	3	0,956	0,778
n	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Média	287,1725	3,161166667	5,060333333	0,55375	0,324833333	4,44376	4,575416667	1,049416667	1,0265
SD	40,49943527	2,061544603	2,279333129	0,181362427	0,01574024	1,98693	1,341179973	0,419984731	0,443721504
EPM	11,69117993	0,595116666	0,657986798	0,052354823	0,004543816	0,57358	0,387165309	0,121239149	0,128091365

Anexo 07: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais DTE de 4 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a letra “A” seguinte ao número representa o grupo de 4 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

CS (8 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1	421,5	2,3	2,8	0,6	0,3318	2,4052	3,326	1,088	-
2	407	5,53	1,89	0,1233	0,3369	3,5474	3,127	1,236	0,737
3	416	6,91	1,8	0,3562	0,3393	3,5821	6,062	0,936	-
4	384,3	2,01	0,67	0,2681	0,3305	1,7334	3,189	1,558	0,6225
5	364	3,6	1,16	0,2902	0,3231	2,3507	1,214	1,064	0,727
6	419,9	2,73	2,2	0,3019	0,3256	2,3377	3,212	1,291	1,5825
n	6	6	6	6	6	6	6	6	4
Média	402,1166667	3,846666667	1,753333333	0,323283333	0,3312	2,659416667	3,355	1,1955	0,91725
SD	23,14678523	1,964226735	0,753861172	0,156362341	0,006259712	0,743074627	1,550003871	0,218337125	0,446512504
EPM	9,449635501	0,801892207	0,307762535	0,063834658	0,002555517	0,303358946	0,632786431	0,089135758	0,223256252

Anexo 08: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais CS de 8 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a ausência da letra “A” seguinte ao número indica o grupo de 8 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

DS (8 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1	431,4	6,5	6,1	0,458	0,3343	4,7998	7,824	2,399	0,8775
2	462,4	9,9	5,3	0,755	0,3422	5,9469	7	2,688	1,1905
3	331,5	1,12	0,806	0,43	0,3409	1,593	1,935	1,516	1,249
4	455,4	6,84	5,04	0,437	0,3497	3,9933	4,064	1,392	-
5	336,7	2,58	0,755	0,595	0,3313	2,6556	4,848	0,796	0,718
6	468,87	7,83	3,83	0,5272	0,3468	4,3504	8,76	1,587	-
n	6	6	6	6	6	6	6	6	4
Média	414,3783333	5,795	3,6385	0,5337	0,340866667	3,889833333	5,7385	1,729666667	1,00875
SD	63,48334913	3,309777938	2,330582223	0,125386363	0,007066164	1,554423681	2,574245812	0,695437896	0,253321436
EPM	25,91696875	1,351211185	0,951456208	0,051188768	0,002884749	0,63459081	1,050931452	0,283911332	0,126660718

Anexo 09: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais DS de 8 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a ausência da letra “A” seguinte ao número indica o grupo de 8 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

CTE (8 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1	398,8	2,3	2,3	0,1431	0,3408	2,3464	4,014	3,31	1,3885
2	375,6	2,3	0,8	0,1922	0,3123	1,786	2,393	1,118	0,676
3	427,6	2,25	0,66	0,2665	0,3139	1,5283	4,984	0,487	-
4	407,9	3,26	1,45	0,446	0,3224	2,6334	6,815	2,779	1,008
5	351,7	1,49	0,64	0,256	0,3165	1,4117	3,122	1,739	0,8235
6	310,13	0,567	0,052	0,239	0,3119	-	1,935	0,953	0,4395
n	6	6	6	6	6	5	6	6	5
Média	378,6216667	2,027833333	0,983666667	0,257133333	0,319633333	1,94116	3,877166667	1,731	0,8671
SD	42,63397256	0,909839638	0,784194279	0,103255405	0,011063032	0,528741802	1,812164829	1,106363231	0,358110563
EPM	17,40524642	0,371440477	0,320145974	0,042153843	0,004516464	0,236460522	0,739813193	0,451670898	0,160151912

Anexo 10: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais CTE de 8 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a ausência da letra “A” seguinte ao número indica o grupo de 8 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

DTE (8 SEMANAS)									
RATOS	PESO (g)	TA RETRO (g)	TA ING (g)	TAM (g)	I. LEE	IA	LEPTINA (ng/mL)	INSULINA (ng/mL)	NEFA (mmol/L)
1	439,6	7,5	3,4	0,6329	0,3456	4,6749	6,714	1,233	1,0215
2	420,3	5,59	3,66	0,5132	0,3271	4,167	6,322	1,645	0,983
3	395,2	3,3	1,42	0,51	0,3123	2,6174	3,538	1,736	0,794
4	412,8	6,27	4,186	0,548	0,3280	4,2251	7,995	1,408	-
5	390,71	5,36	2,1	0,5263	0,3264	3,3423	1,387	0,934	-
6	400	8,315	9,08	0,5397	0,3411	5,9083	8,731	2,423	0,57
n	6	6	6	6	6	6	6	6	4
Média	409,7683333	6,055833333	3,974333333	0,545016667	0,330083333	4,155833333	5,781166667	1,563166667	0,842125
SD	18,33527793	1,762448344	2,70477516	0,045495996	0,011875928	1,129079784	2,796631933	0,510846128	0,206872898
EPM	7,485345869	0,719516524	1,104219835	0,018573663	0,004848327	0,460944892	1,141720206	0,208552059	0,103436449

Anexo 11: Parâmetros biométricos (peso, peso do TA retroperitoneal, inguinal e marrom, índice de Lee e de adiposidade) e bioquímicos (leptina, insulina e NEFAs) dos animais DTE de 8 semanas. Na primeira coluna estão apresentados os animais utilizados no estudo e a ausência da letra “A” seguinte ao número indica o grupo de 8 semanas. Os “-” indicam que os valores não foram mensurados. RETRO - retroperitoneal; ING – inguinal; IA – índice de adiposidade; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.