UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

CAMILA FERNANDA COSTA E CUNHA MORAES BRANDÃO

**Função mitocondrial e fatores de risco cardiovasculares em mulheres
com obesidade submetidas a treinamento físico**

Ribeirão Preto - SP

2018

CAMILA FERNANDA COSTA E CUNHA MORAES BRANDÃO

**Função mitocondrial e fatores de risco cardiovasculares em mulheres
com obesidade submetidas a treinamento físico**

Tese para obtenção do título de doutorado em
Clínica Médica na área de Investigação
Biomédica da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini
Co-orientadora: Dra. Márcia Varela Morandi
Junqueira-Franco.

Ribeirão Preto - SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Brandão, Camila Fernanda Costa e Cunha Moraes

Função mitocondrial e fatores de risco cardiovasculares em mulheres com obesidade submetidas a treinamento físico. Ribeirão Preto, 2018.

142 p.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa de pós-graduação em Clínica Médica / Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Marchini, Julio Sergio.

Co-Orientadora: Junqueira-Franco, Marcia Varella Morandi

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Metabolismo energético. 4. Exercício físico. 5. Doenças cardiovasculares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRANDÃO, CFCCM. Função mitocondrial e fatores de risco cardiovasculares em mulheres com obesidade submetidas a treinamento físico. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleudes da Costa Brandão e Solange Maria Cunha Moraes Brandão, que não mediram esforços em me proporcionarem os estudos e me incentivarem a chegar até o doutorado desde o início da minha graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir vivenciar e finalizar mais uma fase importante em minha vida, por me sustentar e fortalecer, por me dar discernimento nas tomadas de decisão, pelos abrires de portas que aconteceram em todos os momentos e me oportunizar vivenciar momentos que me engrandeceram profissionalmente e pessoalmente. Agradeço pelo dom da vida e do amor, por colocar em meu caminho as pessoas certas no qual deveria e devo compartilhar.

A minha família, meus pais, Cleudes e Solange, meus irmãos e cunhadas, Bruno, Thiago, Lay e Roberta, que sempre me apoiaram, dando amor, carinho e incentivando a não desistir; que sempre me auxiliaram nas tomadas de decisões; sempre foram compreensivos e souberam compartilhar todos os momentos de suas vidas mesmo distante; que choraram comigo com as saudades e sorriram com as vitórias. A minha sobrinha Isabelly, que sempre tentou compreender a distância e fez o possível para se manter perto todos os dias, me enviando áudios para alegrar meus dias e contando suas façanhas da escola.

Ao professor Carlos Alexandre Fett, que me deu a oportunidade em aprender e vivenciar a área da pesquisa desde a graduação, e não mediu esforços em me auxiliar nesta caminhada até chegar ao doutorado e durante o doutorado, com quem sempre pude contar nos momentos de ansiedades e dúvidas. Que confiou em mim ao me indicar a um grande professor.

Ao professor e orientador Julio Sérgio Marchini, que me aceitou antes mesmo de me conhecer, abriu as portas e confiou na minha capacidade; proporcionou as melhores vivências que poderia ter dentro de uma universidade; e colocou desafios em minhas mãos para que eu pudesse desenvolver soluções; e me incentivou a arriscar e a não ter medo; que sempre teve paciência em me ensinar da estatística à fórmula bioquímica; que doou o seu tempo para corrigir todos os trabalhos desenvolvidos por mim; fez o possível para que eu tivesse a oportunidade de vivenciar o estágio sanduíche. Me ensinou não apenas como ser pesquisadora, mas a ser uma pessoa melhor, antes de tudo, ser mais humana e aprender a respeitar as limitações que são impostas a nós.

A minha co-orientadora e amiga, Marcia Varella Morandi Junqueira Franco, que sempre ouviu meus choramingos, reclamações, alegrias e aguentou meus momentos de estresse; que não apenas sorriu e se alegrou comigo, mas que me deu broncas quando necessário; que me ajudou me fortalecendo nos momentos de saudades de casa, que levou lanchinhos e comidas; que me apoiou em todos os momentos no desenvolvimento do projeto, e do decorrer do doutorado; me ensinou a olhar para cada problema de uma

forma diferente e não se abater por qualquer coisa; me incentivou sempre a fazer o melhor e ser uma pessoa melhor. O caminhar foi mais fácil com o seu apoio, presença e experiência.

Aos meus primeiros amigos de Ribeirão Preto, que se tornaram irmãos, o professor Paulo Roberto Pereira Santiago “Preto”, agradeço por me receber, por abrir sua casa, por me levar para todos os lugares, inclusive para fazer provas importantes (TEAP e processo seletivo do doutorado), por me ajudar em dificuldades universitárias às domésticas. Agradeço por sempre estar disposto em todos os momentos que precisei. A Larissa Moraes, que participou desde início comigo também, sempre torcendo, apoiando e fazendo companhia, e mesmo após se mudar de cidade, se preocupou, ligou, me ajudou a ser mais forte a cada dia, veio me visitar e comemorar todos os momentos importantes que tive até aqui. São dois amigos que fizeram toda a diferença em minha vida desde a chegada nesta cidade, permitindo o processo de adaptação menos doloroso.

A professora Carla Barbosa Nonino e seu grupo de pesquisa (LEN), que sempre me ajudaram no que fosse necessário, se tornaram meus amigos. Em especial a Carol Nicoletti, Marcela Pinhel, Cristiana Cortes, Natália Yumi e Bruno Parenti, que sempre estiverão prontos para me auxiliar no que eu precisei, e compartilharam parte de suas vidas comigo, do trabalho à vida social. Agradeço à todo o grupo (Carol Welendorf, Letícia, Flávia, Heitor e Rayana), por trazerem leveza aos dias de trabalho, aos almoços e lanchinhos divertidos.

A professora Ellen Cristini de Freitas e seu grupo de pesquisa (Gabriela, Flávia, Milena, Priscila, Tales e Bryan), por permitirem trocas de experiências e me auxiliarem em todo o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa. Em especial, a Flavia, Gabriela, os alunos de iniciação científica (Daniel, Murilo e Beatriz), e o professor Jonatas, que estiveram comigo nos três meses de coleta de dados, comprometidos, sempre incentivando e ajudando a obter o melhor desempenho e resultados para este trabalho. Permitindo que se tornassem dias divertidos para nós e as voluntárias.

A professora Luciane Carla Alberici, que abriu seu laboratório e disponibilizou tudo o que fosse preciso para a execução deste trabalho, desde a padronização da análise. Ao Anderson de Oliveira Souza, que aceitou participar deste desafio (foram muitas quintas-feiras juntos tentando padronizar a quantidade exata de tecido adiposo que precisamos para a análise da mitocôndria); agradeço por me ensinar cada item do processo e pela disponibilidade de ajudar na elaboração do meu projeto de doutorado. Foi um grande desafio e que surgiu inúmeros aprendizados.

Em nome do professor Marcelo Papoti, agradeço todos os professores e funcionários da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto/USP, que abriram as portas da faculdade permitindo que eu desenvolvesse meu projeto de pesquisa. Além dos alunos do professor Papoti, que me auxiliaram na decisão dos melhores métodos de testes físicos e análises para a execução do projeto.

Em nome do Fernando Chueire, Joyce Oliveira e Rosário Unamumo, agradeço aos residentes, aprimorandas, técnicas e enfermeiras do Hospital das Clínicas, que aceitaram ajudar para que este projeto fosse executado (reserva de sala de biopsia, liberação de materiais para biopsia, coletas de sangue, instruções sobre registros e documentações); sou grata pela quantidade de pessoas que colaborou para que todas as coletas fossem executadas da melhor maneira.

A amiga Thays Gomes, que durante o seu período de residência disponibilizou tempo para realizar todas as coletas de biópsias do meu projeto. Que me ajudou a realizar da melhor maneira, e que me auxiliou a solucionar problemas que aconteceram no início, meio e término do projeto. Agradeço também, pelo companheirismo que me proporcionou extra Hospital das Clínicas, junto com as amigas Amanda, Natália e Mayara, foram muitos cafés e açaís juntas, que trouxeram alegrias ao dia-a-dia.

Ao Gilberto Padovan “Giba” pela disponibilidade e paciência de ensinar várias técnicas, sanar dúvidas e auxiliar no que fosse preciso durante este processo.

A Priscila Fassini, José Henrique e Camila Bitu, que me ensinaram e auxiliaram em todos os processos burocráticos e científicos necessários.

A Dra. Selma Freire de Carvalho da Cunha pela amizade, apoio e incentivo sempre.

Ao grupo do professor Eduardo Ferrioli, com quem tive oportunidade de realizar colaborações e aprender durante este período.

Agradeço o professor Michel Krempf que aceitou me receber na Universidade de Nantes, no período do doutorado sanduíche na França. A toda sua equipe, Mikaél Croyal, Stephanie, Audrey e estudantes, Valentin, Manon e Aurelie, que me receberam e me auxiliaram de todas as formas possíveis; que mesmo com a dificuldade com a língua fizeram com que o meu doutorado sanduíche fosse além de aprender técnicas novas de pesquisa.

Ao André Rodrigues, Andressa Duarte e Arsênio Rodrigues, o alunos que vivenciaram junto a mim o período do doutorado sanduíche em Nantes. Foram

momentos que se tornaram inesquecíveis, sou grata por ter tido vocês por perto num lugar tão longe do meu mundo.

Aos amigos Beatriz Brosco, Ana Paula Pinto e Alisson da Rocha, os conheci no desenvolvimento do projeto e se tornaram parceiros da vida, agradeço por sempre estarem dispostos a ajudar, ouvir, incentivar, se alegrarem, e que independente dos afazeres sempre estiveram presentes.

Aos amigos Bryan Martinez, Simone Costa, Driele Quinhoneiro, Priscila Carvalho, Milena Carvalho e Gabriela Batitucci, pela alegria de viver, companheirismo e ajuda em amenizar as dificuldades da distância da família.

Em nome da Priscila Alencastro, agradeço à todos os meus amigos de Cuiabá, que sempre torceram por mim desde a minha vinda a Ribeirão Preto.

Agradeço à todos do Anexo A da FMPR e USP, com quem convivi neste período, pois todos trouxeram algum aprendizado e auxílio quando necessário.

Agradeço ao apoio financeiro da Capes pela bolsa durante todo o período do doutorado. E, ao CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Agradeço à todas as voluntárias do projeto, que sem a participação e presença de todas não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao Emerson Quirino de Oliveira (secretário do Programa de Pós-graduação em Clínica Médica/FMRP/USP), que auxilia em todos os processos burocráticos referentes ao doutorado.

EPÍGRAFE

**“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o
Senhor lhe dirige os passos”.**

Provérbios 1: 9 (Bíblia Sagrada)

**“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.**

Mahatma Gandhi

RESUMO

BRANDÃO, CFCCM. Função Mitodocondrial e Fatores de risco cardiovasculares em mulheres com obesidade submetidas a treinamento físico. 2018. 142 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

A obesidade, doença multifatorial, ocasiona inúmeros distúrbios no metabolismo lipídico e energético, provocando disfunção na bioenergética mitocondrial. A partir deste fato, o presente estudo teve como hipóteses que: o desequilíbrio na bioenergética mitocondrial e as alterações metabólicas causadas pela obesidade são terapeuticamente modificados com o treinamento físico. Dessa maneira, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade oxidativa e conteúdo mitocondrial em tecido adiposo branco, marcadores de doenças cardiovasculares (esfingolipídios e N-óxido de trimetilamina, TMAO) e as alterações na composição corporal, desempenho físico e taxa metabólica de repouso (TMR) de mulheres com obesidade submetidas a treinamento físico combinado. A casuística do presente trabalho foi composta de 14 mulheres adultas jovens com diagnóstico clínico de obesidade (IMC 33 ± 3 kg/m² e idade 35 ± 6 anos). Foram submetidas a um programa de treinamento físico combinado (exercícios aeróbios e força alternadamente, 55 min à 75-90% da frequência cardíaca máxima, 3 vezes por semana, durante 8 semanas). Todas as participantes foram avaliadas antes e após a intervenção com o treinamento, quanto a: composição corporal, TMR, oxidação de substratos (carboidrato e lipídios) e coeficiente respiratório (QR), desempenho físico, capacidade oxidativa (respiração acoplada: V_{ADP}/V_{OLIGO} , e respiração desacoplada: V_{OLIGO}/V_{CCCP}) e conteúdo mitocondrial (enzima citrato sintase, CS) em tecido adiposo branco, nível de esfingolipídios, TMAO e precursores plasmáticos. Os dados foram analisados pelo test t pareado ou Wilcoxon (as pacientes foram consideradas controle de si próprio), após determinação da normalidade da amostra, considerado nível de significância $p \leq 0,05$. Após a intervenção (treinamento físico combinado), houve o aumento da TMR, oxidação de lipídios e desempenho físico, com redução da oxidação de carboidratos e QR, mas não houve perda de peso e alteração da composição corporal. Após o treinamento combinado houve, o aumento da atividade da enzima CS (marcador de conteúdo mitocondrial) e redução à respiração desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP}). No plasma, o treinamento físico foi capaz de reduzir os níveis de esfingolipídios e TMAO (fatores de risco cardiovasculares). Também foram encontradas correlações positivas entre TMR, oxidação de lipídios e desempenho físico com CS e negativamente correlacionado com respiração desacoplada. Concluindo, o treinamento físico em mulheres com obesidade aumentou o metabolismo energético, com aumento da TMR, conteúdo e grau de acoplamento mitocondrial, aumentou o desempenho físico e reduziu fatores de risco cardiovasculares (TMAO), independente da perda de peso.

Palavras-chave: Obesidade. Exercício físico. Metabolismo energético. Tecido adiposo. Mitocondria. TMAO. Ceramidas. Esfingomiélin.

ABSTRACT

BRANDÃO, CFCCM. Mitochondrial function and cardiovascular risk factors in obese women undergoing physical training. 2018. 142 p. Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo. Ribeirao Preto, 2018.

The obesity, a multifactorial disease, causes various metabolic disorders in lipid and energy metabolism, may induce mitochondrial bioenergetic dysfunction. From this, the present study hypothesized that: mitochondrial bioenergetics dysfunction and metabolic problems caused by obesity are be therapeutically modified with physical training. Thus, the objective of study was to evaluated: the oxidative capacity and mitochondrial content in white adipose tissue, markers of cardiovascular diseases (sphingolipids and trimethylamine N-oxide, TMAO) and changes of body composition, physical performance and resting metabolic rate (TMR) of obese women submitted to combined physical training. The present study was composed of 14 young women with obesity (BMI 33 ± 3 kg/m² and age 35 ± 6 years old). They underwent a combined physical training program (aerobic exercises and strength alternately, 55 min at 75-90% of maximal heart rate, 3 times a week, for 8 weeks). All participants were evaluated before and after the intervention: body composition, TMR, substrates oxidation (carbohydrate and lipids) and respiratory coefficient (RQ), physical performance, oxidative capacity (by mitochondrial respiration - Couple: V_{ADP}/V_{OLIGO} ; Uncoupling: V_{OLIGO}/V_{CCCP}) and Citrate Synthase activity in white adipose tissue, level of sphingolipids, TMAO and precursors from plasma. Data analysis were made by paired t test or Wilcoxon, after normality determination of the sample, with level of significance $p < 0.05$. After intervention with combined physical training, there was an increase in TMR, lipid oxidation and physical performance, reduced carbohydrate oxidation and RQ, but did not cause weight loss and changes of body composition. In adipose tissue, physical activity increased CS activity (mitochondrial content marker) and reduced uncoupling respiration (V_{OLIGO}/V_{CCCP}). In plasma, physical training was able to reduce levels of sphingolipids and TMAO (cardiovascular risk factors). In addition, positive correlations were found between, TMR, lipid oxidation and physical performance with CS and negatively correlation with uncoupling respiration. Therefore, physical training in obese women improve energy metabolism, with increased TMR, content and degree of mitochondrial coupling, increased physical performance and reduced cardiovascular risk factors, regardless of weight loss.

Key-words: Obesity. Physical exercise. Energy metabolism. Adipose tissue. Mitochondria. TMAO. Ceramide. Sphingomyelin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distúrbios provocados pela obesidade.....	29
Figura 2.	Esquema representando a fosforilação oxidativa mitocondrial.....	33
Figura 3.	Tecido adiposo em obesidade.....	34
Figura 4.	Vias de biosíntese do esfingolípídeo.....	35
Figura 5.	Diagrama de eventos moleculares em patologias associadas à esfingolípídeos.....	37
Figura 6.	Formação do TMAO no organismo humano.....	39
Figura 7.	Representação esquemática dos efeitos fisiológicos e metabólicos do exercício físico dinâmico com mudanças na composição corporal.....	42
Figura 8.	Efeitos do exercício aeróbio e resistido sobre variáveis metabólicas..	43
Figura 9.	Diagrama de recrutamento dos participantes do projeto.....	48
Figura 10.	Delineamento experimental do estudo.....	49
Figura 11.	Cronograma das avaliações pré e pós-intervenção.....	50
Figura 12.	Teste físico aeróbio.....	51
Figura 13.	Teste físico de força muscular.....	51
Figura 14.	Parâmetros da respiração mitocondrial em tecido adiposo branco.....	121
Figura 15.	Monitoramento da intensidade do treinamento físico pela frequência cardíaca (FC).....	70
Figura 16.	Monitoramento da intensidade do treinamento físico pela percepção subjetiva de esforço (PSE).....	70
Figura 17.	Concentrações plasmáticas de TMAO e precursores e mulheres com obesidade pré e pós-treinamento físico.....	72
Figura 18.	Conteúdo e respiração mitocondrial em tecido adiposo branco de mulheres com obesidade pré e pós-treinamento físico.....	74
Figura 19.	Expressão gênica de <i>UCPI</i> em tecido adiposo branco de mulheres com obesidade após treinamento físico.....	75
Figura 20.	Coeficiente de correlação entre taxa metabólica de repouso (TMR) e massa livre de gordura.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Medidas antropométricas, composição corporal, taxa metabólica de repouso e oxidação de substratos pré e pós 8 semanas de treinamento físico.....	67
Tabela 2.	Desempenho físico (aeróbico e força) pré e pós 8 semanas de treinamento físico.....	69
Tabela 3.	Concentrações de esfingolipídeos em plasma pré e pós 8 semanas de treinamento físico.....	71
Tabela 4.	Coeficiente de correlação entre Vmax, fosforilação desacoplada (Pearson) e enzima CS (Spearman) com indicadores corporais.....	76
Tabela 5.	Dados brutos de medidas antropométricas pré e pós-intervenção....	122
Tabela 6.	Dados brutos de composição corporal pré e pós-intervenção.....	122
Tabela 7.	Dados brutos de calorimetria indireta pré e pós-intervenção.....	123
Tabela 8.	Dados brutos de teste força musculares pré e pós-intervenção.....	123
Tabela 9.	Dados brutos de TMAO e precursores pré e pós-intervenção.....	123
Tabela 10.	Dados brutos de teste físico aeróbico pré e pós-intervenção.....	124
Tabela 11.	Dados brutos da respiração mitocondrial pré e pós-intervenção.....	124
Tabela 12.	Dados brutos de esfingolipídeos pré e pós-intervenção.....	125
Tabela 13.	Dados brutos de esfingolipídeos pré e pós-intervenção.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Antimicina A
ACT:	Água corporal total
ADP:	Adenosina difosfato
AGL:	Ácido graxo livre
AKT:	Proteína quinase B
AMPK:	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
C1P:	Ceramida-1-fosfato
CAb:	Circunferência do abdômen
CC:	Circunferência da cintura
CCCP:	Carbonil cianeto P-trifluoro-metaxifenil-hidrazona
Cer:	Ceramida
CerS:	Ceramida sintase
CERT:	Proteína de transferência de ceramida
CQ:	Circunferência do quadril
CS:	Citrato sintase
DAG:	Diacilglicerol
DES:	Di-hidro-ceramida desaturase
E:	Estatura
EROS:	Espécies reativas de oxigênio
FADH:	Flavina-adenina
FC:	Frequência cardíaca
FCLan1:	Velocidade da frequência cardíaca no limiar 1
FCLan2:	Velocidade da frequência cardíaca no limiar 2
FECO₂:	Fração expirada de dióxido de carbono
FEN₂:	Fração expirada de nitrogênio
FEO₂:	Fração expirada de oxigênio
FICO₂:	Fração inspirada de dióxido de carbono
FIN₂:	Fração inspirada de nitrogênio
FIO₂:	Fração inspirada de oxigênio
FMO3:	Monooxigenases flavina 3
GSL:	Glicoesfingolípídeo
HDL:	Lipoproteína de densidade alta
HSL:	Lipase hormônio-sensível
IAC:	Índice de adiposidade corporal
IL-1β:	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IMC:	Índice de massa corporal
LDL:	Lipoproteína de densidade baixa
MG:	Massa gorda
MLG:	Massa livre de gordura
NADH:	Nicotinamina-adenina
NAFLD:	Doença hepática gordurosa não alcoólica
OLIGO:	Oligomicina
P:	Peso
PGC-1α	Proliferador de peroxissomo-ativado gama coativador 1-alfa
PP2A:	Proteína fosfatase 2A

PSE:	Escala de percepção subjetiva de esforço
PSE_{Lan1}:	Percepção subjetiva de esforço no limiar 1
PSE_{Lan2}:	Percepção subjetiva de esforço no limiar 2
QR:	Coeficiente respiratório
RM:	Repetições múltiplas
S1P:	Esfingosina-1-fosfato
SM:	Esfingomielina
SMS:	Esfingomielina-sintase
SPT:	Serina palmitoil transferase
TAB:	Tecido adiposo branco
TAG:	Triacilglicerol
TAM:	Tecido adiposo marrom
TLR4:	Receptor do tipo Toll 4
TMA:	Trimetilamina
TMAO:	N-óxido de timetilamina
TMR:	Taxa metabólica de repouso
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
UCP:	Proteína desacopladora
V:	Velocidade
V_{AA}:	Velocidade do consumo de oxigênio não relatado na cadeia de transporte de elétrons.
V_{ADP}/V_{OLIGO}:	Fosforilação acoplada
V_{ADP}:	Velocidade da taxa respiratória em estado de fosforilação
V_{CCCP}:	Velocidade da taxa respiratória em estado não acoplado
V_{CO₂}:	Volume de dióxido de carbono
VE:	Volume expirado
VI:	Volume inspirado
V_{Lan1}:	Velocidade do limiar 1
V_{Lan2}:	Velocidade do limiar 2
VLDL:	Lipoproteína de densidade muito baixa
V_{max}:	Velocidade máxima
V_{O₂}:	Volume de oxigênio
V_{O_{2max}}:	Consumo de oxigênio máximo
V_{OLIGO}/V_{CCCP}:	Fosforilação desacoplada
V_{OLIGO}:	Velocidade de taxa respiratória em estado não fosforilante

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	7
EPÍGRAFE	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	16
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS	18
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 OBESIDADE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS	28
2.2 METABOLISMO ENERGÉTICO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM TECIDO ADIPOSEO.....	29
2.3 ESFINGOLIPÍDIOS EM OBESIDADE E COMORBIDADES ASSOCIADAS	33
2.4 N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO) COMO FATOR DE RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES	37
2.5 EXERCÍCIO FÍSICO COMO PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS	40
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 LOCAL E ASPECTOS ÉTICOS	47
4.2 CASUÍSTICA, CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E RECRUTAMENTO	47
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	48
4.4 AVALIAÇÕES PRÉ.....	52
4.4.1 Entrevista inicial	52
4.5. AVALIAÇÕES PRÉ E PÓS.....	52
4.5.2 Antropometria.....	52
4.5.3 Composição corporal	53
4.5.4 Taxa metabólica de repouso (TMR) e oxidação de substratos	54
4.5.5 Coleta de sangue	55
4.5.6 Biópsia de tecido adiposo branco	58
4.6 TESTES FÍSICOS PRÉ E PÓS-INTERVENÇÃO COM TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO	60
4.6.1 Desempenho Aeróbio.....	60
4.6.2 Repetições Múltiplas (RM).....	60
4.6.3 Análise de lactato	61
4.6.4 Velocidade máxima (Vmax) e Consumo máximo de oxigenio (VO _{2max}).....	61
4.7 INTERVENÇÃO.....	62
4.7.1 Treinamento Físico.....	62
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5. RESULTADOS	66

5.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E TAXA METABÓLICA DE REPOUSO.....	67
5.2 DESEMPENHO FÍSICO AERÓBIO E FORÇA MUSCULAR	68
5.3 MODULAÇÃO DE LIPÍDIOS, TMAO E PERCURSORES PLASMÁTICO.....	71
5.4 CONTEÚDO MITOCONDRIAL E METABOLISMO DE TECIDO ADIPOSE BRANCO.....	73
5.5 CORRELAÇÕES ENTRE OS INDICADORES MITOCONDRIAIS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E DESEMPENHO FÍSICO	75
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	101
ANEXO A - APROVAÇÃO DOS CEPs.....	102
ANEXO B - CÁLCULOS DA COMPOSIÇÃO CORPORAL ATRAVÉS DO MÉTODOS DE DILUIÇÃO DE ÓXIDO DE DEUTÉRIO	105
ANEXO C - CÁLCULOS DO VOLUME DE OXIGÊNIO (VO ₂) E DIÓXIDO DE CARBONO (VCO ₂) POR CALORIMETRIA INDIRETA.....	107
ANEXO D - PARÂMETROS DE MONITORAÇÃO DA REAÇÃO MÚLTIPLA DO TMAO E PRECURSORES UTILIZADOS NA ANÁLISE DE LC-MS / MS.	110
ANEXO E – PARÂMETROS ANALÍTICOS SELECIONADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ESFINGOLIPÍDIOS.....	111
ANEXO F - ESCALA DE PERCEPÇÃO SUBJETIVO DE ESFORÇO (PSE)	112
ANEXO G - FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE AERÓBIO (<i>SHUTTLEN WALKING TEST</i> ADAPTADO)	113
ANEXO H - CLASSIFICAÇÃO DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA PELO CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO (VO ₂ MAX - ML/KG.MIN) PARA O SEXO FEMININO.....	114
APÊNDICES.....	115
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO APROVADO PELOS CEPs.	116
APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE APLICADA NO PROCESSO DE RECRUTAMENTO DAS PARTICIPANTES.	119
APÊNDICE C – PARÂMETROS ANALISADOS NO TECIDO ADIPOSE PARA AVALIAR A RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL ATRAVÉS DO EQUIPAMENTO OROBOROS®	121
APÊNDICE D – DADOS SEM TRATAMENTO ESTATÍSTICO	122
APÊNDICE E – MANUSCRITOS PARA PUBLICAÇÃO	126

1. INTRODUÇÃO

A obesidade, definida como excesso de tecido adiposo, está associada com maior prevalência de comorbidades metabólicas (hipertensão arterial e diabetes mellitus, por exemplo) e mecânicas e/ou estruturais (osteoartrite e apneia obstrutiva do sono) (BRAY; BOURCHARD, 2008). A Organização Mundial de Saúde descreve a obesidade como uma pandemia global e estima-se que em 2030 aproximadamente 50% dos adultos em todo o mundo estejam obesos (WHO, 2017). No Brasil, a ocorrência de sobrepeso na população adulta, aumentou 26% em dez anos (de 43% para 54% entre os anos de 2006 e 2016), enquanto a obesidade aumentou 60% entre 2006 e 2016 (de 12% para 19%) sendo este problema de saúde pública, considerado o mais importante do século XXI (VIGITEL, 2016). Estes números reforçam que a obesidade tem prevalência única e dificilmente comparável a qualquer outra morbidade no mundo atual (SICHERI; SOUZA, 2008).

Trata-se de doença cuja etiopatologia é multifatorial e a qual são atribuídos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (BRAY; BOURCHARD, 2008). De fato tal doença é complexa, participando ainda fatores sociais e mudanças nos hábitos de vida (SURIS et al., 2014).

O tratamento convencional da obesidade é constituído por um plano dietoterápico hiponegativo aliado ao aumento da atividade física objetivando balanço energético negativo, além de enfoque psicológico, medicamentoso e cirúrgico. Porém, o insucesso dessas medidas tem enfatizado a necessidade de outros recursos terapêuticos (BONDIA-PONS et al., 2014) ou esforços para se determinar a real fisiopatologia da obesidade. Tem sido sugerido que, componentes adaptativos, durante a privação alimentar possam causar a termogênese adaptativa, resultando a economia energética, o que pode ser explicada pela capacidade funcional mitocondrial patologicamente alterada (MAJOR et al., 2007).

Assim, a mitocondria de adipócitos pode ter papel importante no desenvolvimento da obesidade através de falhas na função mitocondrial resultando em desequilíbrio entre lipólise e lipogênese, regulação da diferenciação de adipócitos, apoptose, produção de radical de oxigênio e ineficiência da fosforilação oxidativa (DE PAUW et al, 2009; YIN et al., 2014). Portanto, a intervenção terapêutica em qualquer um desses processos mitocondriais pode ser uma abordagem eficiente para reduzir a adiposidade (PESCHECHERA; ECKEL, 2013).

Embora o tecido adiposo branco (TAB) seja considerado energeticamente inerte, ele necessita de mitocôndrias funcionais para gerar ATP suficiente para a

síntese/secreção de adipocinas, lipogênese e lipólise (KOH et al., 2007). Processos fisiológicos associados com o balanço energético positivo estão, provavelmente, associados às alterações na arquitetura mitocondrial e redução da eficiência bioenergética mitocondrial (LIESA; SHIRIHAI, 2013).

Em estudo que comparou a capacidade oxidativa mitocondrial dos adipócitos de obesos e não obesos observou-se que em obesos esta capacidade é reduzida independentemente do tamanho da célula (YIN et al., 2014). A capacidade da respiração mitocondrial é representada pelo grau de acoplamento (produção de ATP), o que representa uma parte substancial do metabolismo energético (JASTROCH et al., 2010). Portanto, implica-se a uma desregulação da função e conteúdo mitocondrial quando relacionada à obesidade. Esta disfunção pode ser devido à carga de substrato mitocondrial a partir dos resultados de uma supra-alimentação, provocando o aumento da atividade na cadeia de transporte de elétrons, ocasionando uma possível sobrecarga, e aumento de espécies reativas de oxigênio (SUBAUSTE; BURANT, 2007; CURTIS et al., 2010). Evidências indicam que os principais fatores que contribuem para as disfunções mitocondriais são: estresse oxidativo, resistência à insulina, fatores genéticos e estilo de vida sedentário (TURNER; HEILBRONN, 2008).

A disfunção do tecido adiposo causado pelo excesso de nutrientes ingerido gera inflamação, que promove infiltração das células imunes no tecido. Então, a inflamação é amplificada sistematicamente para todo o corpo (MATHIS, 2013; VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010). Assim, pode ativar a síntese de lipídios como esfingolipídios, principalmente, devido ao aumento de ácidos graxos livres na circulação sanguínea, que auxiliam na síntese de ceramidas a partir da via *de novo* (BIKMAN; SUMMERS, 2011). Elevados níveis de ceramidas têm sido associados à obesidade e outras doenças metabólicas (BIKMAN; SUMMERS, 2011). Além disso, ceramidas podem estar associadas à alteração da permeabilidade da membrana, intermediada pela inibição da cadeia de transporte de elétrons, promovendo o aumento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (BIKMAN; SUMMERS, 2011; VELUTHAKAL et al., 2005). Pacientes com obesidade possuem baixas taxas de oxidação de ácidos graxos e baixa atividade da cadeia de transporte de elétrons em tecido muscular, em conjunto com alta capacidade glicolítica e aumento do consumo celular de ácido graxo comparado com sujeitos não obesos (HOURMARD, 2008; RITOV et al., 2005).

Estas disfunções relacionadas à obesidade pode desencadear outras comorbidades associadas, como doenças cardiovasculares, e outras complicações metabólicas, como

alteração de microbiota intestinal (TREMAROLI et al., 2015). Recentes estudos mostram que a microbiota intestinal contribui para a regulação da homeostase energética e estoque de gordura, sendo papel importante na obesidade e suas complicações (SMITH et al., 2013; TREMAROLI; BACKHED, 2012). Além disso, a trimetilamina (TMA) um metabólito da microbiota intestinal, produzido a partir do metabolismo de fosfolipídios, carnitina, colina e betaína, é oxidado por monooxigenases flavina 3 (FMO3), originando o N-óxido de trimetilamina (TMAO), identificado como biomarcador de risco de doenças cardiovasculares (CHO; CAUDILL, 2017; RANDRIANARISOA et al., 2016; LI et al., 2017). Elevadas concentrações de TMAO podem provocar o aumento de colesterol nos macrófagos, aumentando as placas ateroscleróticas (CHO; CAUDILL, 2017). Além disso, mudanças na composição corporal podem contribuir para a modulação plasmática de TMAO. Estudo em animais mostrou correlação positiva entre os níveis de TMAO com peso corporal, massa gorda, adiposidade mesentérica e subcutânea (SCHUGAR et al., 2017). Em humanos, foi encontrada associação positiva entre TMAO, índice de massa corporal (IMC) e gordura corporal (RANDRIANARISOA et al., 2016).

Paralelamente, evidências mostram que mudanças no estilo de vida, com o aumento da prática de exercício físico, podem prevenir doenças crônicas (CARDINAL et al., 2015; PALEY; JOHNSON, 2018). O exercício físico provoca o aumento da sensibilidade à insulina, metabolismo lipídico e redução de pressão arterial, em sujeitos saudáveis e pacientes com doenças metabólicas (NICKLAS; YOU; PAHOR, 2005; BERGSTRÖM; BEHRE; SCHMIDT, 2012). Além disso, o treinamento físico pode aumentar o metabolismo energético, devido à alta capacidade do consumo de oxigênio, provocando lipólise no TAB e mobilização de ácidos graxos livres (GOLLISCH et al., 2009). A expressão de marcadores oxidativos e conteúdo mitocondrial são maiores em indivíduos ativos do que em indivíduos sedentários (PINO et al., 2016). Estudos em animais, demonstraram que o exercício provoca aumento da expressão e atividade de marcadores mitocondriais, e, aumento da capacidade termogênica e oxidativa (STANFORD et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2009; TREVELLIN et al., 2014).

Contudo, os efeitos do exercício físico em tecido adiposo de pessoas com obesidade ainda não tem sido bem estabelecidos, e poucos são os estudos que utilizam protocolos de análise da mitocôndria em tecido adiposo subcutâneo em humanos. Assim como, ainda não é bem estabelecido o efeito do exercício físico sobre o TMAO, considerado um fator de risco cardiovascular, relativamente novo. Neste sentido, o

objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico em mulheres com obesidade em relação a:

- 1) capacidade oxidativa e conteúdo mitocondrial em TAB;
- 2) marcadores de comorbidades relacionadas à obesidade, como esfingolipídios e TMAO;
- 3) alterações na composição corporal, desempenho físico e taxa metabólica de repouso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade e alterações metabólicas

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial, que envolve fatores históricos, ecológicos, políticos, socioeconômicos, psicossociais, biológicos e culturais (BRAY; BOURCHARD, 2008). A obesidade é resultante do desequilíbrio energético, porém, atualmente o tratamento com redução da oferta nutricional e aumento do gasto energético não tem sido suficiente para solucionar esta epidemia (KLEIN et al., 2004). Além disso, a obesidade aumenta o risco de diversas doenças, como diabetes, doenças cardiovasculares, osteoartrite, câncer, entre outras (BRAY; BOUCHARD, 2008).

A obesidade também é caracterizada pelo aumento de armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, podendo causar hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; HALBERG et al., 2008). No tecido adiposo são produzidos moléculas bioativas como adipocinas, que são reguladoras do metabolismo sistêmico e possuem propriedade imunoregulatórias (OUCHI et al., 2011; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; OHASHI et al., 2014). O aumento progressivo de adipócitos do tecido adiposo pode provocar necrose e infiltração de macrófagos, levando à superprodução de adipocinas e mediadores pró-inflamatórios (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012; PATEL; BURAS; BALASUBRAMANYAM, 2013). Dessa maneira, a obesidade é uma doença inflamatória crônica que contribui para distúrbios metabólicos como a resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, hiperlipidemia e aterosclerose, hipertensão entre outras doenças cardiovasculares, osteoartrite, câncer, entre outras (BRAY; BOURCHARD, 2008; OUCHI et al., 2011). Este processo inflamatório presente na obesidade pode levar ao estresse oxidativo devido o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012; ROBERTS; SINDHU, 2009). O processo de estresse oxidativo tem origem no desequilíbrio entre a produção de EROS e fatores antioxidantes, podendo levar à oxidação de biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA (BIRBEN et al., 2012).

Um aumento na produção de EROS, inflamação e desequilíbrio crônico no metabolismo energético devido à ingestão excessiva de alimentos e inatividade física podem contribuir também para uma disfunção mitocondrial (PATTI; CORVERA, 2010; FROHNERT; BERNLOHR, 2013). A disfunção mitocondrial é classicamente definida como a incapacidade mitocôndrial para gerar e manter níveis suficientes de ATP (BRAND; NICHOLLS, 2011). Uma vez que, o excesso da ingestão de nutrientes leva a

alta concentração de ácidos graxos livres, hiperglicemia, produção de EROS e afeta a função mitocondrial, estes fatores podem contribuir para o agravamento do processo inflamatório e provocar apoptose celular (KUSMINSKI; SCHERER, 2012; MELLO et al., 2018), **Figura 1**.

Figura 1. Distúrbios provocados pela obesidade.

O excesso de nutrientes está associado à resposta inflamatória na obesidade. O processo inflamatório conduz ao aumento de produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) que provoca a disfunção mitocondrial. O excesso de nutrientes também pode provocar a disfunção mitocondrial e consequentemente aumentar a formação de EROS que pode exacerbar o processo inflamatório em obesidade. Todas essas alterações intracelulares podem provocar a apoptose celular.

*Figura adaptada de Mello et al., (2018).

2.2 Metabolismo energético e função mitocondrial em tecido adiposo

O tecido adiposo é importante para inúmeros processos fisiológicos, composto por várias células: adipócitos, preadipócitos, células vasculares endoteliais, pericitos, macrófagos e fibroblastos (LUNA-LUNA et al., 2015). O tecido adiposo é dividido em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB), cuja principal função é de estoque de gordura

e o tecido adipo marrom (TAM), cuja principal função é aumentar a termogênese (GIRALT; VILLARROYA, 2013). Atualmente, é reconhecido também o processo *browning*, que é o escurecimento do TAB devido a estimulação termogênica (PARK et al., 2014; GIRALT; VILLARROYA, 2013).

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas de humanos e animais, onde ocorrem diversas vias metabólicas (WANG et al., 2010). As mitocôndrias são altamente dinâmicas e compreendem vários compartimentos: duas membranas (externa e interna), espaço intermembranoso, crista, matriz mitocondrial, proteínas e DNA mitocondrial (LOGAN, 2006; ZHANG; ZENG; JIN, 2012).

A mitocôndria é responsável por processos metabólicos, como: ciclo de ácido cítrico, descarboxilação do piruvato, descarboxilação oxidativa de ácidos graxos (β -oxidação). Seu principal papel é sintetizar trifosfato de adenosina (ATP) para utilização celular (WANG et al., 2010; ZHANG, ZENG; JIN, 2012). A produção de ATP requer a oxidação de metabólitos redutores e coenzimas, como dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) e dinucleótido de flavina-adenina (FADH₂) e fosforilação de difosfato de adenosina para gerar ATP, através da fosforilação oxidativa. Esta fosforilação (sistema respiratório mitocondrial), acontece na cadeia de transporte de elétrons que consiste de quatro complexos enzimáticos (I-IV), situados na membrana interna mitocondrial, dois desses complexos são moléculas móveis (coenzima Q e citocromo C). O NADH e FADH são oxidados nos complexo I e II, respectivamente, quando ocorre a transferência de elétrons para os complexos, completando a cadeia no complexo IV, onde os elétrons são transferidos para o O₂, que é reduzido para H₂O. Durante o processo do fluxo de elétrons pelos complexos I, II, III e IV, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o interior do espaço intramembranoso, onde o aumento da sua concentração, fora da matriz mitocondrial, redirecionará o fluxo dos prótons para a ATP síntase, onde ocorrerá a fosforilação de ADP e fosfato inorgânico, produzindo ATP (BERNARD et al., 2006; ZEVIANI; DI DONATO, 2004), **Figura 2**.

Nas membranas mitocondriais também estão situadas as proteínas desacopladoras (UCP), que atuam translocando os prótons em forma de calor, resultando no desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons e da síntese de ATP (**Figura 2**). Em humanos, são expressos cinco UCPs: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 (BOUILLAUD et al., 2001). As UCP1 são expressas principalmente em TAM (CANNON; NEDERGAARD, 2004; KIM et al., 2015), as UCP2 e UCP3 tem sido detectadas no estômago, testículo, adipócitos brancos e marrons, células β pancreáticas,

músculo esquelético e coração (ECHTAY, 2007; SLUSE et al., 2006; MATTIASSON; SULLIVAN, 2006).

Portanto, as mitocôndrias são essenciais para a manutenção da função fisiológica do tecido e a disfunção mitocondrial pode causar mudanças patológicas no corpo humano (WANG et al., 2010). A disfunção mitocondrial pode ser provocada por redução da biogênese mitocondrial, conteúdo mitocondrial e da atividade oxidativa (MONTGOMERY; TURNER, 2014). Falhas (em inglês "*defects*") na transferência de elétrons na membrana mitocondrial podem causar o acúmulo de elétrons nos complexos da cadeia respiratória, que pode resultar em aumento da capacidade de elétrons se ligarem ao oxigênio livre e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (JOHANNSEN; RAVUSSIN, 2009). Além disso, a eficiência bioenergética (capacidade de produção de ATP por molécula de nutriente) pode ser alterada de acordo com a demanda energética (balanço entre consumo/gasto) (LIESA; SHIRIHAI, 2013). E, que devido ao excesso de nutrientes, o organismo recruta mecanismos para utilizá-lo, como exemplo as UCPs, transformando a energia em calor. Porém, isso pode causar redução na eficiência bioenergética e modificação na dinâmica mitocondrial (LIESA; SHIRIHAI, 2013).

A redução da eficiência bioenergética refere-se ao desvio da energia obtida da oxidação de nutrientes para a produção de calor (GOMES; DI BENEDETTO; SCORRANO, 2011). Quando isto acontece, aumentos em UCPs podem ser um mecanismo de proteção aos efeitos prejudiciais associados a sobrecarga de nutrientes, uma vez que as UCPs auxiliam na redução de produção de espécie reativa de oxigênio e aumento da remoção de excesso de nutrientes e seus metabólitos citotóxicos (LIESA; SHIRIHAI, 2013).

A eficiência bioenergética pode ser medida por meio da respiração mitocondrial, onde se controla a taxa respiratória acoplada, identificada como estado 3, que representa o equilíbrio entre a saída e retorno de prótons pela ATP sintase para a síntese de ATP; e a taxa respiratória desacoplada, identificada como estado 4, que representa o retorno de prótons por mecanismos que não envolvem a ATP sintase, resultando na geração de calor e não a síntese de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; PARKER et al., 2009). Esse tipo de medida é realizada experimentalmente mimitizando a fosforilação oxidativa, com a adição de compostos químicos que ativem ou inibem os complexos da cadeia de transporte de elétrons (PARKER et al., 2009). O conteúdo mitocondrial, é frequentemente medido para representar desfechos de biogênese mitocondrial, como

padrão-ouro desta medida, têm-se a microscopia eletrônica e fluorescence (MEDEIROS, 2008). No entanto, uma variedade de medida foi proposta como biomarcador de conteúdo mitocondrial (RITOV; MENSHIKOVA; KELLEY, 2006; KRAUNSOE et al., 2010; LARSEN et al., 2012), como:

1. Conteúdo de proteínas e enzimas mitocondriais (citocromo c, complexos da cadeia de transporte de elétrons, ATP sintase);
2. Conteúdo de cardiolipina (fosfolípido da membrana mitocondrial interna);
3. Conteúdo de DNA mitocondrial;
4. Determinação da atividade enzimática, como atividade da enzima Citrato Sintase (CS), sendo a mais utilizada devido a forte correlação com o conteúdo mitocondrial avaliado por microscopia eletrônica (LARSEN et al., 2012).

Através destas medidas, é encontrado que normalmente o consumo de oxigênio mitocondrial em pessoas com obesidade são menores do que quando comparado com pessoas com peso normal (YIN et al., 2014). A mitocondria de TAB em estado de obesidade não é capaz de atuar com o aumento da demanda de oxidação de ácidos graxos, resultando numa β -oxidação incompleta (KUSMINSKI; SCHERER, 2012). O desequilíbrio do estado redox pode promover o acúmulo de lipídio devido o aumento do fornecimento de NADH com a síntese de ácidos graxos (MUOIO; NEUFER, 2012).

Figura 2. Esquema representando a fosforilação oxidativa mitocondrial.

- (1) início da cadeia de transporte de elétrons através de oxidação de NADH e FADH₂ advindos da β-oxidação no ciclo de Ácido cítrico.
- (2) saída de elétrons pelo complexo IV reduzindo a água.
- (3) retorno de prótons à matriz mitocondrial pela ATP sintase, sintetizando ATP (respiração acoplada).
- (4) vazamento de prótons pelo desacoplamento da ATP sintase (respiração desacoplada).

$\Delta\Psi$: potencial de membrana mitocondrial.

H⁺: prótons que são transportados da matriz mitocondrial pelos complexos (I, II, III e IV) da cadeia de transporte de elétrons.

UCP: proteína desacopladora.

* Figura adaptada de Kikusato et al., (2016).

2.3 Esfingolipídios em obesidade e comorbidades associadas

Os lipídios são moléculas hidrofóbicas, componentes fundamentais das membranas biológicas e são classificados de acordo com sua estrutura e função. Além da função estrutural de membranas, fornecimento de barreiras entre os compartimentos, os lipídios desempenham papéis como: armazenamento de energia, sinalização autócrina, parácrina e autofagia (ICHIMURA et al., 2000).

Sendo que podem ser classificados em (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 2008):

1. Lipídios simples: ácidos graxos, gorduras neutras (mono, di e triglicerídeos) e ceras (ésteres do esteroide e ésteres não-esteroidais);

2. Lipídios compostos: fosfolipídios, esfingolipídios, glicolipídios e lipoproteínas;
3. Lipídios derivados, álcoois (incluindo esteróis e hidrocarbonetos).

As alterações dos lipídios são observadas durante mudanças corporais, como a obesidade, que resultam no aumento do risco de doenças cardiovasculares (MIKA; SLEDZINSKI, 2017; FLEGAL et al., 2007). Estudos demonstram que o metabolismo de esfingolipídios são modulados em condições de obesidade, que alteram o estado inflamatório em tecido adiposo e células imunes (KOLAK et al., 2007; HOLLAND et al., 2011). A inflamação e lipólise promovem a liberação de ceramida (o principal intermediário do metabolismo de esfingolipídios), a partir de adipócitos, que são refletidos em aumento da sua concentração na corrente sanguínea (KANG et al., 2013). Evidências sugerem que a síntese de ceramidas pode ser ativada pelo aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres, citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hormônios (SAMAD et al., 2006; SCHILLING et al., 2013), **Figura 3**.

Figura 3. Tecido adiposo em obesidade.

O excesso de tecido adiposo contribui para inflamação sistêmica e lipotoxicidade causando o aumento de citocinas inflamatórias e ao acúmulo de metabólitos lipídicos em outros tecidos.

DAG: diacilglicerol.

TAG: triacilglicerol.

Cer: ceramida.

SM: esfingomielina.

TNFα: fatores de necrose tumoral alpha.

AGL: ácidos graxos livres.

*Figura adaptada de Kang et al., (2013).

Os principais esfingolípídios bioativos são: ceramidas (Cer), esfingosina, esfingomielinas (SM), esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato (C1P), que atuam como moléculas sinalizadoras regulando vários eventos fisiológicos como proliferação celular, apoptose e inflamação (FUTERMAN; HANNUN, 2004; HANNUN; OBEID, 2008; MORAD; CABOT, 2013).

Os esfingolípídios são sintetizados pela via *de novo ceramide*, a partir da condensação de serina e palmitoil-CoA pela serina palmitoil transferase (SPT) seguida de uma série de reações envolvendo as enzimas: cetoesfinganina redutase-3, ceramida sintase (CerS), di-hidro-ceramida desaturase (DES). Cer é o precursor na biosíntese de outros esfingolípídios. No retículo endoplasmático, o Cer pode ser desacetilado para formar a molécula da esfingosina, que é fosforilada em forma de esfingosina-1-fosfato (S1P) (HANNUN; OBEID, 2008), **Figura 4**. Cer também é transportado do retículo endoplasmático para o Golgi através de proteína de transferência de ceramida (CERT), necessária para a síntese de SM (WANG et al., 2009).

Figura 4. Vias de biosíntese do esfingolípido.

SPT: serina palmitoil transferase.

DES1: di-hidro-ceramidose saturase 1.

SMS: esfingomielina-sintase.

* Figura adaptada de Kang et al., (2013).

No plasma existem mais de 200 espécies de esfingolipídios distribuídos em lipoproteína de alta densidade (HDL), apolipoproteína B (ApoB) e albumina. Os esfingolipídios podem estar associados com lipoproteínas por vários mecanismos e podem ser transferidos de uma lipoproteína para outra (QUEHENBERGER et al., 2010; HAMMAD et al., 2012). Os Cers constituem aproximadamente 3% dos esfingolipídios no plasma e estão presente na lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade baixa (LDL) e lipoproteína de densidade alta (HDL) (HAMMAD et al., 2010). Os SM são os esfingolipídios mais abundantes nas lipoproteínas e constituem aproximadamente 87% dos esfingolipídios no plasma. Aproximadamente, 63 a 75% e 25 a 35% de SM estão associados com VLDL/LDL e HDL, respectivamente (HAMMAD et al., 2010). Assim também, o S1P é uma molécula sinalizadora bioativa que modula muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos com seus receptores (PROIA; HLA, 2015). Porém, o S1P é mais abundante no plasma do que em outros tecidos e, é encontrado principalmente no HDL (50 a 60%) e albumina (30 a 40%) (HAMMAD et al., 2012; CAMONT et al., 2013; KSIAZEK et al., 2015).

Com isto, os altos níveis de SM no plasma estão associados com aumento de aterosclerose e tem sido proposto ser um fator de risco independente para doença cardiovascular em humanos (JIANG et al., 2000), uma vez que o LDL possui altos níveis de esfingomielina, e estão presentes em placas ateroscleróticas nas paredes arteriais (GUYTON et al., 1996; SCHISSEL et al., 1996). Da mesma forma, os altos níveis de Cer no plasma, também estão associados com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (KASUMOV et al., 2015), razões pelas quais algumas espécies de Cer serem preditivas para morte da artéria coronariana em doença cardiovascular, independente de marcadores lipídicos e de proteína C-reativa, pois promovem agregação de lipoproteínas, instabilidade de placa, inflamação e apoptose (LEAKSONEN et al., 2016). Diferente do SM e Cer, o aumento de S1P no plasma parece promover uma cardioproteção, devido ser elevado em HDL (BORODZICZ et al., 2015). Então, aumentos de SM e Cer, e, redução de S1P no plasma podem contribuir para doenças cardiovasculares (IQBAL et al., 2017), **Figura 5**.

Figura 5. Diagrama de eventos moleculares em patologias associadas a esfingolipídios.

Em diabetes, obesidade e doença hepática gordurosa não-alcoolica (NAFLD), reduz a síntese de adiponectinas anti-inflamatórias e aumenta a produção de citocinas inflamatórias permitindo o aumento da produção de ceramidas. A obesidade também causa a ativação da via de sinalização do receptor do tipo Toll 4 (TLR4), que leva à ativação da esfingomielinase (SMase) a ceramida. Em NAFLD, a insulina não é capaz de inibir a atividade da lipase hormônio-sensível (HSL) no tecido adiposo, provocando o aumento de ácidos graxos livres (AGL), especialmente ácido palmítico, que são desviados para a síntese de ceramidas. As ceramidas, por sua vez, aumentam a atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A), desfosforila e inativa a proteína quinase B (AKT), provocando a resistência à insulina. O aumento de ceramidas é um substrato para síntese de esfingomielina (SM) e glicoesfingolipídeo (GSL), que aumentam o risco de doenças cardiovasculares. Enquanto a esfingosina 1-fosfato (S1P) que é cardioprotetor, está reduzida.

*Figura adaptada de Iqbal et al., (2017).

2.4 N-óxido de trimetilamina (TMAO) como fator de risco de doenças cardiovasculares

O TMAO é um composto orgânico pertencente à classe dos óxidos de amina com a fórmula $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$, ocorre sob a forma de um sólido incolor e geralmente é encontrado como um diidrato, em animais, plantas e fungos, com origem exógena e endógena (YANCEY, 2001; PREUGSCHAT et al, 2014). Em humanos, é por via

exógena, e é oxidado através de trimetilamina (TMA) produzida pela flora intestinal (KOETH et al., 2013). O TMAO foi encontrado para servir como um receptor de elétrons no metabolismo anaeróbico de várias bactérias que vivem principalmente nos três ambientes: o ambiente marinho (por exemplo, *Alteromonas* e *Vibrio*), em lagoa salobra (bactérias fotossintéticas não enxofre) e intestinos de animais (*Enterobacteriaceae*). Nas *Enterobacteriaceae*, uma parte normal da flora intestinal humana, a respiração anaeróbica com TMAO parece auxiliar a fosforilação oxidativa (SUZUKI et al., 1992; UFNAL et al., 2015). Por outro lado, o TMAO inibe o crescimento de outras bactérias, como o *Staphylococcus aureus*, que é um importante patógeno em humanos e animais (SUZUKI et al., 1992; UFNAL et al., 2015).

O TMAO é derivado principalmente a partir da dieta rica em colina e carnitina, que através da ação da microbiota intestinal, metaboliza esses constituintes para a TMA. A TMA é absorvida e transportada via a circulação sanguínea para o fígado, onde é oxidada por flavina-monooxigenases-3 (FMO3) para TMAO (BENNETT et al., 2013; KOETH et al., 2014; WANG et al., 2011), **Figura 6**.

A concentração sistêmica de TMAO em indivíduos saudáveis é entre 0,5 e 5,0 μM (UFNAL et al., 2015; WANG et al., 2011). Na maioria dos indivíduos, 50% do TMAO não é metabolizado e é excretado inalterado em 24 horas, pela urina, suor e respiração (ZHANG; MITCHELL; SMITH, 1999; SUBRAMANIAM; FLETCHER, 2017). Porém, concentrações elevadas permitem que as metilaminas (TMA e TMAO) sejam distribuídas por todo o corpo e se acumulando em diversos tecidos (CHO; CAUDILL, 2017; TANG et al., 2013; VELASQUEZ et al., 2016).

Figura 6. Formação do TMAO no organismo humano.

A partir da dieta rica em fosfolípidios (colina e carnitina), com a sua degradação no intestino, é formado a trimetilamina (TMA) pela microbiota intestinal, que é oxidada em N-Óxido de Trimetilamina (TMAO) através de Flavina-monooxigenases (FMOs) no fígado. Quando formado TMAO, pode ser transportado à corrente sanguínea, auxiliando na formação de placas ateroscleróticas.

DCV: Doenças cardiovasculares.

*Figura adaptada de Wang et al., (2011).

Muitos estudos tem associado elevados níveis de TMAO no plasma com doenças cardiovasculares (WANG et al., 2011; TANG et al., 2014; TROSEID et al., 2015). A elevada translocação de bactérias intestinais, o aumento das respostas inflamatórias e do estresse oxidativo são consequência de isquemia e congestão intestinal induzida por insuficiência cardíaca, além de que os elevados níveis plasmáticos de TMAO está associada à disfunção diastólica e a baixa sobrevida (TANG et al., 2015). O TMAO possui importante efeito no metabolismo do colesterol nos compartimentos de ácidos biliares e provoca o aumento de colesterol nos macrófagos e formação de placas ateroscleróticas (WANG et al., 2011; KOETH et al., 2014). O aumento dos níveis de TMAO no plasma também está associado com o aumento de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-6 e proteína C reativa), assim como alterações em vias lipídicas (ROHRMANN et al., 2016; OBEID et al., 2016).

2.5 Exercício físico como prevenção e tratamento de doenças

A inatividade física é um fator de risco independente para doença cardiometabólica e mortalidade por todas as causas (BISWAS et al., 2015). Uma vez que o exercício físico prolongado induz a adaptações funcionais e estruturais no sistema cardiovascular, respiratório, musculoesquelético e metabólico. O exercício físico é considerado uma espécie de polipílula devidos os seus efeitos na saúde (FIUZA-LUCES et al., 2013). Todas as adaptações induzidas pelo exercício físico ocorrem em curto prazo para suprir a demanda energética aumentada pela contração muscular, e em longo prazo reduz o distúrbio homeostático. Assim, o organismo desenvolve resistência à quebra da homeostasia por distúrbios metabólicos, protegendo contra patologias (EGAN; ZIERATH, 2013; HAWLEY et al., 2014). Porém, a qualidade e intensidade dessas alterações dependem do tipo, intensidade e duração da realização do exercício físico (VILLELLA; VILLELLA, 2014).

Atualmente, existe consenso de recomendação do nível de atividade física, como: 150 minutos por semana de exercício físico com intensidade moderada ou 75 minutos por semana de exercício físico (ACSM, 2008; THOMPSON et al., 2003). Porém, essas diretrizes populacionais são mais eficazes para a promoção de saúde e prevenção primária de fatores de risco para doenças crônicas do que reversão de doenças já estabelecidas (BROOKS; BUTTE; RAND, 2004; SARIS et al., 2003). De fato, o exercício físico como tratamento requer uma dose maior de exercício, além de um planejamento individualizado.

O exercício físico exige a geração de força pelas fibras musculares esqueléticas, que podem ser geradas conforme a tensão e o comprimento dos músculos trabalhados. Essas ações, também são resultados de alterações bioquímicas e estruturais que ocorrem nas fibras musculares esqueléticas após a ativação neural e a utilização de ATP. Durante os exercícios físicos, os músculos alternam entre ações estáticas e dinâmicas (RIVERA-BROWN; FRONTERA, 2012; FLETCHER et al., 2004).

Em ações estáticas ou isométricas, os miofilamentos de miosina e actina formam pontes cruzadas e geram força, mas a resistência externa é maior que a força produzida pelo músculo, e, embora haja despêndio energético, não ocorre trabalho (trabalho= força x distância), pois não há deslocamento (FLETCHER et al., 2004).

Em ações dinâmicas, ocorre contração de grande grupamento muscular que permite o movimento, com contração concêntrica e/ou excêntrica. Na contração

concência, os músculos produzem força suficiente para superar uma resistência, miosina e miofilamentos de actina formam pontes cruzadas, os filamentos deslizam passando um pelo outro, ocorre a movimentação das articulações e o encurtamento muscular. Existe a produção de força, deslocamento e o gasto energético resultam no trabalho. Na contração excêntrica, ocorre o alongamento muscular no momento da geração de força. O alongamento ocorre porque a resistência externa se move na direção oposta ao encurtamento. Essas ações musculares fornecem um importante estímulo de treinamento devido a alta força gerada pelos elementos contráteis (WITVROUW et al., 2007; FLETCHER et al., 2004).

Em exercícios com ações dinâmicas, ocorre o aumento da frequência cardíaca e do volume sistólico com um aumento do débito cardíaco como resultado (**Figura 7**). Este aumento é proporcional ao aumento da intensidade do exercício, assim como o aumento da pressão sanguínea sistólica, enquanto ocorre a estabilização ou redução da pressão sanguínea diastólica. Em exercícios com ações isométricas, permitem o aumento da resistência vascular e pressão sanguínea, pequenos efeitos no débito cardíaco e consumo de oxigênio. Neste sentido, os exercícios dinâmicos são mais apropriados para tratamento de doenças cardiovasculares, enquanto, os exercícios isométricos e resistidos, podem ser utilizados para pessoas condicionadas fisicamente, com o intuito de melhorar o desempenho físico (FLETCHER et al., 2004; SCHULER; ADAMS; GOTO, 2013).

Figura 7. Representação esquemático dos efeitos fisiológicos e metabólicos do exercício físico dinâmico com mudanças na composição corporal.

GER: gasto energético de repouso.

CHO: carboidrato.

*Figura adaptada de Julian et al., (2018).

O exercício aeróbio representa um poderoso estímulo para aumento da capacidade, conteúdo e função respiratória mitocondrial, devido sua principal fonte energética ser oxidativa, com aumento de consumo de oxigênio e número de capilares por fibra muscular (LAUGHLIN; ROSEGUINI, 2008; HOLLOSZY, 2008). A biogênese e dinâmica mitocondrial pode ser alterada devido a ativação da proteína AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), conhecida como um sensor energético pelo aumento da razão AMP e ATP em decorrência do aumento do dispêndio energético (ROMANELO; SANDRI, 2015). Dessa maneira, o exercício físico pode ser indutor da ativação de AMPK, via que regula a absorção de glicose e ácidos graxos (MARCINKO; STEINBERG, 2014), desacetilases (como sirtuina 1) e aumento de proteína nuclear PGC1 α , que estão presentes na regulação de biogênese e dinâmica mitocondrial (GRANATA et al, 2018).

Em obesidade, estudos apresentam o exercício aeróbio como o principal modulador de perda de peso e aumento da aptidão cardiorrespiratória, reduzindo todas as causas e mortalidade por doença cardiovascular (MURIAS; KOWALCHUK;

PATERSON, 2010; LAUGHLIN; ROSEGUINI, 2008; HOLLOSZY, 2008). Porém, a inclusão do exercício resistido é um potente estímulo para o aumento de massa, força e potência muscular, podendo ajudar a preservar a musculatura, que tende a diminuir com a perda de peso e podendo maximizar a redução de gordura corporal e sustentando a capacidade funcional (LANDI et al., 2014). Incluir exercícios aeróbios e força no mesmo treinamento tem sido considerado apropriado, devido a associação dos seus efeitos (SILLANPAA et al., 2008), **Figura 8**. Mesmo em curto prazo (8 a 16 semanas) de atividade física pode-se diminuir a pressão arterial e melhorar o perfil de lipoproteínas do sangue e sensibilidade à insulina (SIMONS; ANDEL, 2006). Os efeitos benéficos do exercício físico em regular lipídios plasmáticos em humanos ou modelos de obesidade em roedores estão bem documentados (HU et al., 2010). Durante o exercício, a proporção relativa de absorção de ácidos graxos no músculo em atividade é substancialmente aumentada, porque os ácidos graxos são o principal combustível durante o exercício prolongado (SCHOISWOHL et al., 2010).

Variável	Exercício aeróbio	Exercício resistido
Metabolismo da glicose		
Tolerância à glicose	↓↓	↓↓
Sensibilidade à insulina	↑↑	↑↑
Lipídios séricos		
HDL colesterol	↑↔	↑↔
LDL colesterol	↓↔	↓↔
Pressão sanguínea de repouso		
Sistólica	↓↔	↔
Diastólica	↓↔	↓↔
Composição corporal		
% de gordura	↓↓	↓
Massa corporal magra	↔	↑↑
Metabolismo basal	↑	↑↑
Força muscular	↔	↑↑↑
Capacidade aeróbia		
VO _{2máx}	↑↑↑	↑↔
Tempo de exercício aeróbio máximo ou submáximo	↑↑↑	↑↑
↑ = aumento nos valores; ↓ = redução nos valores; ↔ = valores não alteram; ↑ ou ↓ = pequeno efeito; ↑↑ ou ↓↓ = médio efeito; ↑↑↑ ou ↓↓↓ = grande efeito; HDL colesterol = colesterol de alta densidade; LDL colesterol = colesterol de baixa densidade.		

Figura 8. Efeitos do exercício aeróbio e resistido sobre variáveis metabólicas.
(CIOLAC; GUIMARÃES, 2004)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do treinamento físico combinado no metabolismo energético e marcadores cardiovasculares de mulheres com obesidade.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar antes e após 8 semanas de treinamento físico combinado em mulheres com obesidade:

- 1) Medidas antropométricas, composição corporal, taxa metabólica de repouso, oxidação de substratos e desempenho físico;
- 2) Função mitocondrial através do consumo de oxigênio (respiração mitocondrial) e conteúdo mitocondrial (enzima citrato sintase), e, expressão de proteínas desacopladoras;
- 3) Marcadores associados a fatores de risco de doenças cardiovasculares (esfingolipídios e TMAO);
- 4) Correlacionar parâmetros corporais (composição corporal e taxa metabólica de repouso), desempenho físico e parâmetros de função mitocondrial (respiração mitocondrial e citrato sintase).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local e aspectos éticos

Este estudo prospectivo e longitudinal envolveu o departamento de Clínica Médica (Divisão de Nutrologia) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP/USP), a Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP/USP) e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). Desta maneira, o projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa dos respectivos departamentos citados (nº dos pareceres respectivamente 1.387.040, 1.471.636, 1.474.901, **Anexo A**), registrado no site de ensaios clínicos randomizados (ClinicalTrials.gov: NCT03119350). Todas as voluntárias recrutadas foram informadas sobre os objetivos e procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice A**).

4.2 Casuística, critérios de elegibilidade e recrutamento

Para o desenvolvimento deste estudo foi necessário à inclusão de mulheres com diagnóstico clínico de obesidade e posteriormente classificados pelo Índice de Massa Corporal (IMC de 30 a 40 kg/m²), idade entre 20 a 40 anos, sedentárias, ciclo menstrual regular, por amostragem de conveniência. Trata-se, portanto, de um ensaio clínico nos quais as participantes são controles de si mesmas, e as participantes foram pareadas e avaliadas em dois momentos: Pré (antes da intervenção) e Pós (após a intervenção).

Como critérios de não inclusão no estudo foram considerados: ingestão de medicamentos, fumantes, etilismo, comorbidade associada (hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, hipotireoidismo), qualquer impedimento físico ou funcional para a prática de exercício físico, cirurgia bariátrica ou qualquer tipo tratamento para perda de peso. Foram excluídas as participantes que precisassem efetuar algum tratamento médico, ou com ingestão de medicamentos e com menos de 50% de presença nas atividades planejadas por este protocolo (explícitas adiante). Os critérios de elegibilidade e recrutamento estão expostos no diagrama de consort (**Figura 9**).

4.3 Delineamento Experimental

estudo incluiu avaliações pré-intervenção (realizado no HCFMRP/USP), duas semanas de adaptação, aprendizado e realização dos testes físicos, oito semanas de treinamento físico combinado (realizados na EEFERP/USP) e avaliações pós-intervenção (realizado no HCFMRP/USP) conforme **Figuras 10, 11, 12 e 13**.

Figura 9. Diagrama de recrutamento dos participantes do projeto.

Dados de estatísticos de pacientes extraídos do sistema de atendimentos médico do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC/RP).

Figura 10. Delineamento experimental do estudo.

Seleção dos participantes: entrevista (feita por contato telefônico) com as participantes para verificar os critérios de inclusão.

Avaliação Pré e Pós: coleta de sangue, ingestão de água com óxido de deutério e coleta de urina (composição corporal), biópsia de tecido adiposo subcutâneo, calorimetria indireta (taxa metabólica em repouso), medidas antropométricas (peso, altura e circunferências corporais).

Teste físico: aptidão cardiorrespiratória (*shuttlen walking test* adaptado) e força muscular (repetições múltiplas).

FC: frequência cardíaca.

RM: repetições múltiplas.

PSE: percepção subjetiva de esforço.

Figura 11. Cronograma das avaliações pré e pós intervenção.

Foram avaliadas 4 participantes por dia. Coleta de urina e ingestão de água com óxido de deutério foi utilizada para o cálculo da composição corporal. Coleta de sangue foi utilizada para análise de lipídios e fatores de doenças cardiovasculares. Medidas antropométricas foram: peso, estatura, circunferências da cintura, do abdomen e do quadril. Calorimetria indireta foi utilizada para medir a taxa metabólica em repouso. Biópsia de tecido adiposo foi utilizada para análise da função mitocondrial.

Figura 12. Teste Físico aeróbio.

Foi realizado do 1º dia das sessões de testes físicos, no final da segunda semana de adaptação e após a última sessão de treinamento físico. O teste teve hora para iniciar, mas não teve hora para finalizar, pois cada participante acabou de acordo com sua exaustão física individual. Durante o teste físico, também foi coletado 25 µL de sangue para a análise do limiar anaeróbio. Coleta de sangue antes e após o teste: análise do lactato basal e pico. FC: frequência cardíaca. PSE: percepção subjetiva de esforço. Houve dois horários de teste físico assim como os treinamentos: 17h30 à 18h30 e 18h30 à 19h30.

Figura 13. Teste físico de força muscular.

Foi realizado no 2º dia das sessões de testes físicos, no final da segunda semana de adaptação e após a última sessão de treinamento físico. O teste teve hora para iniciar, mas não teve hora para finalizar, pois cada participante acabou de acordo com sua exaustão física individual. FC: frequência cardíaca. PSE: percepção subjetiva de esforço. Nas avaliações pré, foi executado o teste de repetições múltiplas em todos os exercícios do circuito de treinamento (para determinação da carga do treinamento). Nas avaliações pós, foi executado apenas nos exercícios: agachamento, remada e supino. Houve dois horários de teste físico assim como os treinamentos: 17h30 à 18h30 e 18h30 à 19h30.

4.4 Avaliações Pré

4.4.1 Entrevista inicial

Inicialmente, foi explicado o objetivo e avaliações propostas para responder as hipóteses do estudo e após o aceite, foi aplicado um questionário com os critérios de inclusão e não inclusão para confirmar a elegibilidade das participantes no projeto (**Apêndice B**).

4.5. Avaliações Pré e Pós

4.5.2 Antropometria

4.5.2.1 Peso e estatura

Foram avaliados o peso corporal (kg) e estatura (cm) por meio de balança de plataforma do tipo Filizola® *Eletronica ID 1500* (São Paulo, Brasil), com precisão de 0,1 kg e 0,5 cm respectivamente. As participantes foram pesadas pela manhã, em jejum de 12 horas, usando o mínimo de roupas e sem sapatos. A estatura foi obtida com a participante em pé, descalça, enconstando a nuca, as nádegas e calcanhares na parede onde existia uma barra graduada (VANNUCCHI et al., 1984).

4.5.2.2 Índice de massa corporal (IMC)

A partir das medidas de peso e estatura, foi calculado o IMC (kg/m²) por meio da fórmula:

$$IMC = \frac{P}{E^2}$$

Onde:

P= peso corporal expresso em quilogramas (kg), e;

E= estatura em metros (m).

4.5.2.3 Circunferências

Foi utilizada fita métrica flexível, inextensível, com precisão de 0,1 cm, em posição ortostática, de acordo com as técnicas convencionais descritas por Pollock et al., (1986). A circunferência da cintura (CC) foi medida com o abdomen relaxado, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, com a paciente em pé. A circunferência abdominal (CAb) foi medida em cima da cicatriz umbilical. A circunferência do quadril (CQ) foi medida com as pernas unidas, na maior circunferência em torno das nádegas.

4.5.2.4 Índice adiposidade corporal

Foi avaliado o índice adiposidade corporal (IAC) utilizando as circunferências cintura e altura. O índice é estabelecido conforme a seguinte fórmula (WOOLCOTT; BERGMAN, 2018):

$$IAC = 64 - \left(20 \times \frac{Altura}{CC} \right) + (12 \times sexo)$$

Onde:

Altura: medida expressa em metros;

CC: circunferência da cintura expressa em metros;

Sexo: para homens= 0; para mulheres= 1.

4.5.3 Composição corporal

A análise da composição corporal foi feita pelo método de diluição de óxido de deutério (isótopo estável do hidrogênio, não radioativo), considerado padrão ouro para a determinação de composição corporal. Após a administração oral como óxido de deutério ($^2\text{H}_2\text{O}$), é misturado com a água do corpo e depois eliminado pela urina, saliva e suor. Dentro do organismo, o óxido de deutério se comporta como água e, em questão de horas, é diluído uniformemente nos compartimentos de água do corpo.

Cada participante em jejum de 12 horas recebeu uma dose de 100 gramas de óxido de deutério a 7% (Cambridge Isotope, EUA) diluído a 100 mL de água potável e

mantidos em frascos âmbar. A injeção da dose foi feita com um canudo para evitar derramamento e consequente perda do deutério da água. Após a ingestão dos 100 mL, foi inserido mais 50 mL de água potável, no frasco, misturado e ingerido novamente com o mesmo canudo, por duas vezes, para que garantir que todo o deutério fosse ingerido. Amostras de urina foram coletadas antes e três horas após a ingestão da dose deuterada. As amostras de antes e depois foram armazenadas separadamente em gelo imediatamente após a coleta, para evitar qualquer contaminação entre os frascos. Na sequência, foram armazenadas apenas 5 mL de cada amostra em criotubos e armazenadas separadamente (amostras antes e após ingestão da dose) em freezer -20 °C até a análise (PFRIMER et al, 2012). O enriquecimento de deutério nas amostras de urina foi determinado por espectrometria de massa (Europa Scientific Hydra System™, Cheshire, Reino Unido). Foram utilizadas 500 µL das amostras de urina em triplicata, equilibradas com 100% de hidrogênio com bastões catalisadores de platina (Sercon Ltda®, Gateway, Crewe, U.K.). Após a análise, a composição corporal foi determinada usando a fórmula de acordo com Aleman-Mateo et al., (2010) (**Anexo B**).

4.5.4 Taxa metabólica de repouso (TMR) e oxidação de substratos

Foi utilizada a calorimetria indireta (QUARK-RMR COSMED®, Roma, Itália) para avaliação da taxa metabólica de repouso e oxidação de substratos. Todas as participantes ficaram em jejum durante 12 horas, não fizeram exercício físico, não ingeriram bebidas a base de cafeína e chá preto ou bebida alcoólica, 24 horas antes da avaliação. Todas as medidas foram realizadas das 8h00 às 10h00 da manhã. O equipamento foi calibrado automaticamente com concentrações de gases conhecidas antes de todas as avaliações, de acordo com as especificações do fabricante. Durante a avaliação, as mulheres ficaram deitadas na posição supina em uma sala silenciosa, a uma temperatura estável entre 21 e 24 °C. O volume de consumo de oxigênio (V_{O_2}) e produção de dióxido de carbono (V_{CO_2}) foi medido por 30 minutos (**Anexo C**). As medidas obtidas nos primeiros 10 minutos foram descartadas, para garantir que o participante atingisse um estado estacionário (WEIJS; VANSANT, 2010). A equação de Weir (1949) foi usada para estimar a TMR. A equação de Frayn (1983) foi utilizada para calcular as taxas de oxidação de carboidratos e gorduras, ou seja:

$$TMR (kcal/dia) = (3,941Vo_2 + 1,106Vco_2) \times 1440$$

Onde:

TMR: taxa metabólica de repouso;

Vo₂: volume de oxigênio consumido em L/min;

Vco₂: volume de dióxido de carbono produzido em L/min;

1440: número de minutos por dia.

$$Oxidação Carboidrato (g/dia) = (4,585 \times Vco_2 - 3,226 \times Vo_2) \times 1440$$

$$Oxidação Lipídios (g/dia) = (1,695 \times Vo_2 - 1,701 \times Vco_2) \times 1440$$

Onde:

Vo₂: volume de oxigênio consumido em L/min;

Vco₂: volume de dióxido de carbono produzido em L/min;

1440: número de minutos por dia.

4.5.5 Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas após 12 horas em jejum em tubos com heparina e EDTA, o plasma foi separado por centrifugação à 3.500 rpm durante 15 minutos (4° C), e armazenado em freezer -80°C até a realização as análises.

4.5.5.1 Quantificação de N-óxido de trimetilamina (TMAO) e precursores plasmático

O TMAO e seus precursores (betaina, colina, carnitina e TMA) foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) Xevo® TQD com uma interface de eletropulverização e um dispositivo Acquity H-Class® UPLC™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Todos os solventes foram de grau cromatográfico e adquiridos da Biosolve® (Valkenswaard, Netherlands). Os padrões foram obtidos da Sigma Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, France). Foi preparado um conjunto de solução padrão de referência e diluído em série com acetonitrila para obter uma curva de 7 soluções padrões entre 0.05-10 µmol/L. Das amostras de plasma (20

μL) o TMAO e precursores foram então extraídos com 180 μL de acetonitrila contendo padrões internos exógenos de 3 μmol/L ($^2\text{H}_9$ -colina, $^2\text{H}_9$ -carnitina, $^{13}\text{C}_2$ -betaina, [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-TMA and $^2\text{H}_9$ -TMAO). As amostras foram misturadas e centrifugadas durante 10 min a $10.000 \times g$ (10 °C). Sobrenadantes foram transferidos para frascos de vidros pequenos e para serem analisados pelo LC-MS/MS. Destas amostras, 10 μL (de TMAO e precursores) foram injetados em uma coluna C18 HILIC[®]-BEH (, 1.7 μm-de tamanho da partícula; 2.1mm diâmetro interno $\times$ 100 mm de comprimento Waters Corporation[®], mantida a 30° C, e os compostos foram separados por um gradiente linear de fase móvel B (98% acetonitrila, 0.1% ácido fórmico e 1,9% água MQ, e na fase móvel A (10 mmol/L acetato de amônio, 0.1% ácido fórmico) a uma taxa de fluxo de 400 μL/min. A fase móvel A foi mantida constante por 1 min com 1%, aumentando linearmente de 1% a 45% até 6,5 min, mantendo 45% até os 7 minutos, retornando à condição inicial de 1% aos 8,5 minutos mantendo se constante por mais 2,5 minutos antes da próxima injeção. Os compostos alvos foram então detectados pelo espectrômetro de massa (LC-MS/MS) com a interface de electropulverização operando no modo de íon positivo (voltagem capilar, 1,5 kV; fluxo de gas de dessolvatação (N_2) e temperatura, 650 L/h e 350 °C; e temperatura da fonte, 150 °C). Os modos de monitoramento de múltiplas reações foram aplicados para detecção de MS/MS conforme detalhado em **Anexo D**. As razões da área do pico cromatográfico entre compostos não rotulados e seus respectivos padrões internos constituíram a resposta do detector. Soluções padrões foram usadas para plotar curvas de calibração para quantificação. A linearidade foi expressa por media do r^2 que foi superior a 0.998 para todos os compostos (regressão linear, 1/x ponderação, origem excluída). As imprecisões intra e inter ensaio foram inferiores a 9,7% para todos os compostos. As recuperações foram avaliadas com padrões internos e foram superiores a 96% (TRENTÉSEAU et al., 2017). Importante ressaltar que a TMA endógena não foi detectada na maioria das amostras e, portanto, não foi documentada aqui.

4.5.5.2 Quantificação de esfingolipídeos plasmático

Um conjunto de soluções padrões de referência, incluindo esfingosina-1-fosfato (S1P; d18: 1), nove espécies de ceramida (Cer) e nove espécies de esfingomielina (SM) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA; **Anexo E**), foram preparados com diluição em série com metanol para obter sete soluções padrões, entre 1–500 nmol/L, 2–1000

nmol/L e 0.04–20 mmol/L para Cer, S1P e SM, respectivamente. Das amostras de plasma, 10 µl, (dos esfingolipídeos), foram extraídos com 500 µl de uma mistura de metanol/cloroformio, (2/1, v/v) contendo padrões internos exógenos [IS; Cer (d18: 1/17: 0) 500 nmol/L; S1P (d17:1) 500 nmol/L; e SM (d18:1/17:0), 5 µmol/L]. As amostras foram misturadas e centrifugadas por 10 minutos a $20,000 \times g$ (10 °C), e os sobrenadantes foram secados sob um fluxo de nitrogênio gasoso e solubilizados em 100 µL de metanol puro, para análise em cromatografia líquida, acoplada à espectrometria de massa (LC–MS/MS), realizada em espectrometro de massa Xevo TQD com interface de eletropulverização e sistema Acquity H-Class® UPLC™ (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A aquisição e análise de dados foram realizadas com software MassLynx₁ e TargetLynx₁ versão 4.1, respectivamente (Waters Corporation, Milford, MA, USramA).

Destas amostras, 10 µl foram injetados em uma coluna LC de fase reversa Acquity® BEH C18, de 2.1 Ø x 50 mm comprimento, onde os compostos foram separados. As fases móveis foram: fase A: 5/95 (acetonitrila/água v/v) + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de solução de formato de amônio e a fase B: 50/50 (isopropanol / acetonitrila, v/v) + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de formato de amônio. O gradiente de eluição do U-HPLC, acoplado ao MS foi composto por: minuto zero 60% fase A, aos 4 minutos 1% ficando até 5,5 minutos e aos 6 minutos 60%, permanecendo até os 8 minutos, para então reiniciar nova análise. Os esfingolipídios foram detectados por MS com interface de eletropulverização operando em modo de íon positivo (voltagem capilar, +3 kV; fluxo de gás de dessolvatação [N₂] e temperatura, 1000 L/h e 400 °C; temperatura da fonte, 150 °C. O modo de monitoramento da reação múltipla (MRM) foi aplicado (**Anexo E**). A linearidade foi expressa por média do r^2 e foi >0,998 para todos os compostos (regressão linear, 1/x ponderação, origem excluída). As imprecisões intra e inter-ensaio do método analítico foram avaliados em quatro experimentos distintos (seis repetições para quatro concentrações), e os RSDs eram <13%, <6% e <9% para Cer, SM e S1P, respectivamente. Recuperações foram avaliadas com IS e foram > 91% (CROYAL et al., 2018).

4.5.6 Biópsia de tecido adiposo branco

O tecido adiposo subcutâneo foi coletado por biópsia no quadrante superior abdominal direito, acima da cicatriz umbilical. O tecido coletado foi dividido em duas partes:

1. análise imediata da respiração mitocondrial (consumo de oxigênio);
2. Armazenados em tubos de RNA livre a -80 °C para análises de expressão gênica.

4.5.6.1 Medida do consumo de oxigênio mitocondrial

As amostras de tecido adiposo (aproximadamente 50 mg de tecido) foram homogenizadas em 1 mL de solução tampão para manutenção das células do tecido vivas (BIOPS, 2,77 mM Ca^{2+} -EGTA, 7.23 mM EGTA, 6.56 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM taurina, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol, 0.5 mM ditioneitol (DTT), 50 mM 2-[N-morfolino]-ácido etanossulfônico (KMES) and 5.77 mM ATP) mais 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de saponina durante 10 minutos à 100 rpm. Posteriormente, as amostras foram adicionadas em 2 mL da solução tampão de respiração MiR05 (20 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 110 mM sacarose, 20 mM taurina, 60 mM K-lactobionato, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 e 1 g/L de BSA livre de ácidos graxos, pH 7,1) a 37°C e 900 rpm, o consumo de oxigênio foi monitorado utilizando um respirometro de alta resolução (OROBOROS *Oxygraph*®) equipado com o software DatLab (OROBOROS, Innsbruck, Austria) para a aquisição de dados (2 segundos de intervalo) e análises. As taxas respiratórias em estado de fosforilação foram determinadas na presença de NAD^+ exógenos ligados a uma mistura de substratos (1.5 mM de piruvato, 0.28 mM de malato, 1.3 mM de glutamato) e 240 μM ADP (V_{ADP}). Após, os estados respiratórios não fosforilante (V_{OLIGO}) e não acoplado (V_{CCCP}) foram determinados com a adição de 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de oligomicina e 0.50 μM (titulação) até 2 μM , respectivamente. O consumo de oxigênio não relatado na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (V_{AA}) foi determinado com 0.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de antimicina A (KRAUNSOE et al., 2010). As taxas respiratórias foram normalizadas com a concentração de proteína determinadas por método de Bradford (1976). O valor do V_{AA} foi subtraído das taxas em outros estados respiratórios (Figura 14, Apêndice C).

4.5.6.2 Análise da atividade da enzima Citrato Sintase (CS)

A atividade da CS foi mensurada nas amostras após a análise do consumo de oxigênio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas com tampão Trietanolamina-HCl (0.1 M) pH 8,0, para promover a ruptura das membranas mitocondriais. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, após, o sobrenadante foi coletado e a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade da CS foi mensurada por espectrofotômetro de acordo com Srere (1969) usando um modelo *Cary 50MPR Varian* Espectrofotometro (Varian Ltd.®, Melbourne, Australia). Cada amostra foi analisada em quintuplicada e os valores de absorbância foram expressos pela quantidade total de proteína na amostra. A atividade da CS foi calculada seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Citrato Síntase } (\mu\text{mol/mL/min}) = \left(\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} \right) \times \left(\frac{V}{\epsilon^{\text{mM}}} \right) \times L$$

Onde:

A_{412} : é a absorbância do TNB em 412 nm;

V: é o volume (mL) da reação;

ϵ^{mM} : coeficiente equimolar do TNB, o qual é 13,6 mM⁻¹cm⁻¹

L: distância (cm) para mensuração da absorbância.

4.5.6.3 Análise de expressão gênica de UCP

Para o RT-qPCR (reação em cadeia quantitativa de polimerase em tempo real), foi realizado o isolamento do RNA total usando Tri Reagente (Sigma-AldrichTM, St. Louis, USA) de acordo com especificações do fabricante. O kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied BiosystemsTM, California, USA) foi utilizado para a reação de transcrição reversa de acordo com o protocolo do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas tréplicas em placa de 96 poços (Applied BiosystemsTM, California, USA) com GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI-USA). As sequências de primers usadas são UCP1: F- 5' TGTCCTGGGAACAATCACCG 3'; R-5' TCCAGGATCCAAGTCGCAAG 3', como primers descritos anteriormente (BARBAGALLO et al., 2016). GAPDH (F-5'AGACACCATGGGGAAGGTGA 3' e

R-5'TGGAATTTGCCATGGGTGGA 3') foram usados como genes de referências. O método de $\Delta\Delta C_t$ foi usado para comparar os níveis da expressão (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.6 Testes físicos Pré e Pós-intervenção com treinamento físico combinado

4.6.1 Desempenho Aeróbio

Foi realizado uma adaptação do *Shuttle Walking Test* (SINGH et al., 1992), composto de 9 estágios com duração de 3 minutos cada, iniciando o primeiro estágio com velocidade de 4 km/h, aumentando 1 km/h a cada estágio, até a exaustão. O teste era interrompido quando as participantes não conseguiam acompanhar o ritmo determinado pelo metrônomo. No intervalo de 30 segundos a cada estágio foi colhido 25 µL de sangue pelo lóbulo da orelha para determinação do limiar anaeróbio através da análise de lactato (MEDBO et al., 2000). Foi anotada a frequência cardíaca e a percepção subjetiva de esforço de cada participante, no início, a cada estágio, no final do teste e o tempo total dos estágios (**Anexo G**). Além disso, foi realizada a coleta de 25 µL de sangue pelo lóbulo da orelha, imediatamente, 3, 5, 7 e 10 minutos após o término do teste para a análise do pico do lactato.

4.6.2 Repetições Múltiplas (RM)

Foi realizado o teste de RM em todos os exercícios no momento pré-intervenção, para a determinação da carga dos exercícios durante o treinamento físico. No momento pós-intervenção, foi realizado apenas nos exercícios de agachamento, supino reto e remada. A carga foi determinada pelo teste de repetições múltiplas, onde, com uma carga estipulada deveria ser executada um determinado número de vezes. Após, os valores da carga e da porcentagem foram identificados por meio das equações de Brzycki (1993):

$$RM (\%) = 102,78 - (REP \times 2,78)$$

$$RM (kg) = PS \times \left(\frac{100}{102,78} \right) - (REP \times 2,78)$$

Onde:

RM = repetições múltiplas;

REP = número de repetições executadas;

PS = peso suportado (kg).

4.6.3 Análise de lactato

No início, durante (a cada término de estágio) e no final do teste físico aeróbio (*shuttlen walking test* adaptado), foram coletadas amostras sanguíneas, após assepsia com álcool 70% por meio da punção manual do lóbulo da orelha com lancetas picadora de aço inox. Foram retirados 25 µL de sangue em tubos capilares previamente calibrados e heparinizados (1%). Imediatamente, o sangue foi armazenado em tubo plástico de 1,5 mL contendo 50µL de fluoreto de sódio (NaF-1%) (CONCEIÇÃO et al., 2014). As amostras foram analisadas por meio de lactímetro eletroquímico (Yellow Springs Instruments® modelo 1500 Sport, Ohio, USA).

Após a análise do lactato, foram utilizados pontos fixos para o limiar anaeróbio: o limiar 1 (2 mmol) e limiar 2 (3,5 mmol), para determinar as medidas de: frequência cardíaca (FC), velocidade (V) e percepção de esforço (PSE) em ambos limiares (FCLan 1 e 2, Vlan 1 e 2, PSElan 1 e 2). Essas medidas foram determinadas por meio da construção de curvas entre os valores de lactato e FC, V ou PSE, realizadas pelo programa OriginPro versão 7.0 (OriginLab Corporation®, Northampton, MA, USA).

4.6.4 Velocidade máxima (Vmax) e Consumo máximo de oxigênio (VO_{2max})

O Vmax, representa a intensidade máxima obtida durante o teste e foi calculado após a determinação do Vlan 2, de acordo com a equação proposta por Kuipers et al., (1985):

$$V_{max} = E_{com} + \left(\frac{t}{DE} \right) \times I$$

Onde:

Ecom= velocidade (km/h) do último estágio completo (utilizamos a velocidade do limiar anaeróbio 2);

t= tempo (segundos) de permanência no último estágio incompleto;

DE= tempo (segundos) de duração de um estágio completo;

I= incremento de intensidade (nesse estudo foi de 1 km/h).

O consumo de oxigênio máximo foi estimado por meio da distância do último estágio do teste e calculado de acordo com a equação proposta por Heyward (2004):

$$VO_{2max} = 0,25 \times V + 3,5$$

Onde:

V= velocidade do último estágio do teste em metros/minutos.

4.7 Intervenção

4.7.1 Treinamento Físico

Foi realizada na academia da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto/USP. Inicialmente, as participantes foram orientadas quanto ao tipo de atividade a ser desempenhada e como controlar a intensidade durante mesma. Executando o treinamento durante 8 semanas com frequência de 3 vezes por semana e duração de 55 minutos em cada dia. O treinamento físico foi composto conforme descrito a seguir (FETT et al., 2009):

Aquecimento: era realizado em movimento combinando caminhada e alongamentos simultâneos (5 minutos);

Circuito: composto de 15 estações de exercícios de força para membros superiores e inferiores. Cada exercício era realizado durante 30 segundos (média de 15 repetições) intercalados por 30 segundos de caminhada/corrida; realizado até completar 45 minutos; os exercícios de cada estação foram feitos até cumprir o tempo estipulado ou exaustão muscular;

Volta à calma: após o circuito eram alongados os grupamentos musculares trabalhados (5 min).

Intensidade do Treinamento Físico: cada participante teve sua intensidade individualizada de acordo com os testes físicos, entre 70 e 90% da repetição múltiplas e a frequência cardíaca (FC) de acordo com o limiar anaeróbio. A escala subjetiva de esforço adaptada (PSE) foi utilizada como apoio complementar (**Anexo F**).

Estações do Circuito: As estações consistiam dos seguintes exercícios:

- 1. Crucifixo reto:** decúbito dorsal em um banco apropriado; empunhar um par de alteres com os cotovelos semiflexionados; fazer o movimento de extensão horizontal até o peso chegar na linha dos ombros sem movimento dos cotovelos. Grupamento muscular: ombro (deltóide anterior), peitoral maior e tríceps.
- 2. Flexora:** em posição decubito ventral, na máquina própria (mesa flexora), com os calcanhares apoiados em lugar próprio, era flexionado o joelho na maior amplitude possível. Grupamento muscular: Isquiotibiais (músculos semitendinoso, semimembranoso e bíceps femural), gástrcnêmio, poplíteo, plantar, sartório e grácil.
- 3. Rosca bíceps:** em posição ortostática, braços estendidos ao longo e laterais do corpo; flexionar os cotovelos em sua total amplitude; retornar a posição inicial controlando a descida no peso na fase excêntrica da contração. Grupamento muscular: bíceps braquial, braquioradial e braquial; quadríceps femoral, isquiopoplíteos e glúteo máximo contração isométrica.
- 4. Extensora:** sentado em máquina própria (cadeira extensora), com o apoio das costas um pouco inclinado, o quadril mantido a 90° durante todo o movimento. Era realizado a extensão dos joelhos, na maior amplitude possível. Grupamento muscular: quadríceps femural (vastos medial, lateral e intermédio, e o reto femural).
- 5. Abdominal reto:** decúbito dorsal no solo; joelhos flexionados aproximadamente 90° e unidos, plantas dos pés no chão; elevam o tronco até que saísse do solo, mas a lombar ficava apoiada no chão; olhavam para o teto, retornando a posição inicial em seguida. Grupamento muscular: reto abdominal.

6. **Panturilha:** posição ortostática; de frente para parede e mãos apoiadas; elevou-se o corpo na ponta dos pés e retornou em seguida a posição inicial. Grupamento muscular: tríceps sural (gastrocnêmio, gêmeo lateral e gêmeo medial).
7. **Supino reto:** deitado em decúbito dorsal, sobre um banco próprio, a pegada na barra deveria ser maior que os ombros. A barra trazida próximo ao peitoral, com uma adução dos ombros sem que os cotovelos ultrapassem a altura dos ombros. Os ombros realizam uma adução transversal na fase concentríca e uma abdução transversal na fase excêntrica. Grupamento muscular: peitoral maior, deltóide anterior e tríceps braquial.
8. **Leg press:** sentado, na máquina de *leg press* 180°, pés no local apropriado e na mesma linha, pernas e joelhos afastados (largura dos ombros). O joelho deveria ser flexionado e estendido, fazendo fora para empurrar o banco no qual a participante estava sentada. Grupamento muscular: quadríceps, músculos posteriores e adutores.
9. **Puxada frente:** sentado, com as mãos fixas na barra, ocorria a contração dos flexores do cotovelo e adução do ombro, aproximando o braço ao antebraço. O antebraço devia permanecer perpendicular ao chão durante toda a amplitude do movimento. Grupamento muscular: grande dorsal.
10. **Abdominal infraumbilical:** decúbito dorsal no solo; joelhos e quadris flexionados a 90°; o quadril era elevado em direção ao tronco, mantendo as pernas flexionadas. Grupamento muscular: reto abdominal.
11. **Remada:** sentado em máquina própria, o movimento é de extensão e flexão de cotovelos. Iniciou-se flexionando os cotovelos (90°) ao lado do tronco, após realizava uma extensão voltando a posição inicial. Grupamento muscular: grande dorsal, deltoide posterior e tríceps.
12. **Agachamento:** posição ortostática; pés levemente mais afastados que a largura dos ombros; flexionavam os joelhos a aproximadamente 90°, retornando a seguir a posição inicial; no 1º mês foi realizado

somente com o peso corporal; no segundo mês foi acrescentada halteres com anilhas seguradas lateralmente. Grupamento muscular: quadríceps femoral (reto femoral, vasto lateral, vasto medial, vasto intermédio), isquiopoplíteos (bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso); glúteo máximo.

13. Desenvolvimento: posição ortostática; empunham-se os alteres na altura dos ombros, face das mãos para frente; os braços eram estendidos acima da cabeça e retornar a posição inicial. Grupamento muscular: tríceps, ombros (deltóide anterior e médio), peitoral maior porção clavicular.

14. Avanço: iniciando em posição orstostatica, deveria dar uma passada a frente e realizar uma flexão do quadril e joelhos, até que o joelho da perna de tras quase toque o solo. Deveria retomar a posição inicial, trocar as pernas com outra passada e dando continuidade no mesmo movimento. No primeiro mês foi executado sem peso, incluindo halteres e anilhas que foram segurados lateralmente a partir do segundo mês. Grupamento muscular: quadriceps, isquiotibiais e gluteo máximo.

15. Tríceps: em pé, realizado em uma polia, a executante deveria estar um pouco para trás do cabo ao invés de logo abaixo dele, realizava a extensão completa dos cotovelos e retomava a posição inicial no mesmo ritmo da extensão. Grupamento muscular: triceps braquial.

4.8 Análise estatística

A estatística descritiva dos dados consistiu em valores médios e erro padrão da média de ambos momentos de avaliações (pré e pós intervenção). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e posteriormente analisados por *test t de Student* ou *Wilcoxon*, para comparar os momentos pré e pós intervenção. Teste de Pearson ou Spearman foram realizados para verificar possíveis correlações entre as variáveis estudadas. O nível de significância foi determinado em $p \leq 0,05$. As análises foram realizada pelos software estatísticos GraphPad™ Prism versão 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) e SPSS (versão 20.0, Inc. Chicago.IL).

5. RESULTADOS

5.1 Dados antropométricos, composição corporal e taxa metabólica de repouso.

As voluntárias mantiveram o peso corporal em ambos os momentos de avaliações, aumento e redução de 3% de massa magra e gordura corporal respectivamente, sem diferença estatística. Contudo, houve redução da circunferência da cintura e índice de adiposidade corporal ($p < 0,05$). Além das mudanças na taxa metabólica de repouso, com aumento de 38% e 73% da TMR e oxidação lipídica, respectivamente, e, redução de 42% da oxidação de carboidratos e 7% do coeficiente respiratório (**Tabela 1**).

Tabela 1. Medidas antropométricas, composição corporal, taxa metabólica de repouso e oxidação de substratos pré e pós 8 semanas de treinamento físico.

Variáveis	Pré	Pós	<i>p</i>
Altura (cm)	162 ± 1	-	-
Peso (kg)	86 ± 2	87 ± 3	0,169
IMC (kg/m ²)	33 ± 1	33 ± 1	0,150
Circunferência cintura (cm)	93 ± 2	91 ± 2	0,008
Circunferência abdômen (cm)	106 ± 2	105 ± 2	0,509
Circunferência quadril (cm)	118 ± 2	118 ± 2	0,701
IAC	41 ± 1	40 ± 1	0,015
Gordura corporal (kg)	40 ± 1	39 ± 2	0,628
Gordura corporal (%)	47 ± 1	45 ± 1	0,312
Massa livre de gordura (kg)	46 ± 2	48 ± 2	0,190
Massa livre de gordura (%)	53 ± 1	55 ± 1	0,312
Água corporal total (ml)	33701 ± 1237	34785 ± 1068	0,187
Água corporal total (%)	39 ± 1	40 ± 1	0,312
TMR (kcal/dia)	1415 ± 120	1790 ± 52	<0,001
QR (V_{O_2}/V_{CO_2})	0.75 ± 0.2	0.70 ± 0.2	<0,001
Oxidação lipídica (g/dia)	121 ± 32	189 ± 51	<0,001
Oxidação de carboidrato (g/dia)	72 ± 19	-10 ± -3	0,004
Oxidação total (g/dia)	193 ± 52	179 ± 48	0,491
V_{O_2} (L/min)	0,206 ± 0,01	0,264 ± 0,01	<0,001
V_{CO_2} (L/min)	0,154 ± 0,01	0,185 ± 0,01	0,008

Dados expressões em média ± erro padrão da média. IMC: índice de massa corporal. IAC: índice de adiposidade corporal. TMR: taxa metabólica de repouso. QR: coeficiente respiratório. V_{CO_2} : volume de oxigênio consumido. V_{CO_2} : volume de dióxido de carbono produzido.

5.2 Desempenho físico aeróbio e força muscular

Apesar da pouca mudança na composição corporal, o treinamento físico foi suficiente para aumentar o desempenho físico das participantes. Observa-se na **Tabela 2**, que apenas não houve diferença estatística para frequência cardíaca e pico de lactato. O tempo e velocidade do teste aeróbio aumentou em 9% e 13% respectivamente, assim como a capacidade aeróbia Vo_{2max} (estimado) e $Vmax$ (calculado de acordo com o limiar anaeróbio 2) aumentou 8%, além das participantes mudarem a classificação do Vo_{2max} de regular para boa a excelente (HERDY; CAIXETA, 2016, **Anexo H**).

O desempenho de força muscular aumentou em média 22% (agrupamento muscular do peitoral), 36% (agrupamento muscular dorsal) e 138% (agrupamento muscular quadriceps) (**Tabela 2**).

Através do resultado do teste físico, limiar anaeróbio e RM, foi determinado a FC e sobrecarga que as participantes deveriam atingir durante o treinamento. Foi estipulada a intensidade de 70 a 90% progressivamente para todos os exercícios. Estão apresentados nas **Figuras 15 e 16** as médias das FC e PSE em três momentos de cada sessão de treinamento (FC e PSE 1: 5 minutos do treinamento; FC e PSE 2: 30 minutos do treinamento; FC e PSE 3: 55 minutos do treinamento). Observamos que a partir do meio da sessão de treinamento ambas medidas aumentaram, assim como com o decorrer dos dias de treinamento, corroborando, as medidas realizadas com as estipuladas.

Tabela 2. Desempenho físico (aeróbio e força) pré e pós 8 semanas de treinamento físico

Variáveis	Pré	Pós	<i>p</i>
Estágio	4 ± 1	5 ± 1	0,008
Velocidade (kg/h)	7 ± 1	8 ± 1	0,008
Tempo (minutos)	13 ± 1	15 ± 1	0,001
FC repouso (bpm/min)	84 ± 3	87 ± 2	0,350
FC final (bpm.min)	187 ± 2	184 ± 3	0,279
V _{O2max} (ml/kg/min)	35 ± 1	38 ± 1	0,012
Vmax (km/h)	7 ± 1	8 ± 1	0,005
Lactato _{pico} (mmol/L)	9 ± 1	8 ± 1	0,136
VLan1 (km/h)	5 ± 1	6 ± 1	0,001
FCLan1 (bpm/min)	138 ± 6	147 ± 4	0,003
PSE Lan1	3 ± 1	5 ± 1	<0,001
VLan2 (km/h)	6 ± 1	7 ± 1	<0,001
FCLan2 (bpm/min)	157 ± 6	167 ± 3	0,042
PSE Lan2	5 ± 1	7 ± 1	<0,001
RM supino (kg)	29 ± 2	35 ± 3	0,043
RM remada (kg)	45 ± 2	60 ± 3	<0,001
RM agachamento (kg)	36 ± 6	68 ± 5	0,001

Dados expressos em média ± erro padrão da média. Resultados obtidos do *shuttlen walking test*. Estágio: número de estágios concluídos do teste físico. Tempo: tempo total do teste físico. FC repouso: frequência cardíaca em repouso antes do teste físico. FC final: frequência cardíaca no final do teste físico. Vo_{2max}: consumo de oxigenio máximo calculado. V Lan1, V Lan2: velocidade no limiar anaeróbio 1 e 2. FCLan1, FCLan2: frequência cardíaca no limiar anaeróbio 1 e 2. PSE Lan1 e PSE Lan2: percepção de esforço no limiar anaeróbio 1 e 2.

Figura 15. Monitoramento da intensidade do treinamento físico pela frequência cardíaca (FC).

FC1: 5 minutos da sessão de treinamento;
 FC2: 30 minutos da sessão de treinamento;
 FC3: 55 minutos da sessão de treinamento.

Figura 16. Monitoramento da intensidade do treinamento físico pela percepção subjetiva de esforço (PSE).

PSE1: 5 minutos da sessão de treinamento;
 PSE2: 30 minutos da sessão de treinamento;
 PSE3: 55 minutos da sessão de treinamento.

5.3 Modulação de lipídios, TMAO e precursores plasmático

A intervenção de treinamento físico provocou a redução de 18 lipídios dentre ceramidas e esfingomielina, sendo que 10 com diferença estatística (**Tabela 3**). Assim como as concentrações plasmáticas de TMAO (**Figura 17**), que reduziram significativamente 16% após o treinamento físico (de $8,2 \pm 1,7$ para $5,4 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/L}$), independente do aumento de colina (+26%, de $1,6 \pm 0,1$ para $2,0 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/L}$), enquanto não houve diferença para os outros precursores como betaina ($32,2 \pm 2,5$ para $31,9 \pm 2,9$ $\mu\text{mol/L}$) e carnitina (de $41,4 \pm 2,2$ para $41,1 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/L}$).

Tabela 3. Concentrações de esfingolipídeos em plasma pré e pós 8 semanas de treinamento físico.

Lipídios	Pré (nmol/L)	Pós (nmol/L)	$\Delta\%$	<i>p</i>
S1P d18:1	$392,2 \pm 23,0$	$445,3 \pm 26,2$	+ 20	0,187
Cer 16:0	$201,9 \pm 9,8$	$160,1 \pm 13,4$	- 18	0,029
Cer 18:0	$133,0 \pm 16,2$	$104,8 \pm 11,3$	- 14	0,043
Cer 20:0	$14,9 \pm 1,9$	$13,6 \pm 1,2$	- 11	0,498
Cer 22:0	$1909,2 \pm 110,0$	$1421,1 \pm 100,3$	- 20	0,014
Cer 24:0	$265,8 \pm 12,1$	$214,6 \pm 18,1$	- 14	0,072
Cer18:1	$9,5 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,6$	- 11	0,112
Cer 20:1	$7,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,7$	- 13	0,120
Cer 22:1	$7,2 \pm 0,9$	$6,7 \pm 0,7$	- 15	0,588
Cer 24:1	$1099,0 \pm 91,0$	$956,5 \pm 99,0$	- 2	0,329
SM 16:0	$54,6 \pm 1,5$	$48,0 \pm 2,4$	- 12	0,024
SM 18:0	$9,4 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,6$	- 17	0,025
SM 20:0	$18,3 \pm 0,8$	$16,2 \pm 1,0$	- 11	0,049
SM 22:0	$19,8 \pm 0,8$	$17,0 \pm 1,2$	- 14	0,025
SM 24:0	$20,4 \pm 0,8$	$15,2 \pm 1,5$	- 25	0,003
SM 18:1	$3,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	- 14	0,043
SM 20:1	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	- 14	0,047
SM 22:1	$19,7 \pm 0,8$	$18,5 \pm 1,2$	- 5	0,333
SM 24:1	$34,5 \pm 1,8$	$33,4 \pm 2,5$	- 2	0,682

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. S1P: esfingosina-1-fosfato. Cer: ceramidas. SM: esfingomielina. $\Delta\%$: diferença percentual entre os momentos pré e pós- intervenção.

Figura 17. Concentrações plasmáticas de TMAO e precursores em mulheres com obesidade pré e pós treinamento físico.

(A) TMAO (N-óxido de trimetilamina),

(B) Colina,

(C) Betaina.

(D) Carnitina.

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Símbolos pretos indicam valores “pré intervenção”.

Símbolos brancos indicam valores “pós intervenção”.

5.4 Conteúdo mitocondrial e metabolismo de tecido adiposo branco

O conteúdo mitocondrial e consumo de oxigênio foram avaliados em biopsias de tecido adiposo subcutâneo antes e depois do treinamento físico. Houve aumento da atividade da enzima Citrato Sintase (CS), um clássico e confiável marcador de conteúdo mitocondrial, indicando o estímulo de biogênese mitocondrial. As taxas respiratórias em mg por proteína nos estados de fosforilação (V_{ADP}) e desacoplado (V_{CCCP}) não mudaram, o estado não-fosforilado (V_{OLIGO}) reduziu. Porém, as taxas do fluxo de controle, informações sobre o controle respiratório independente do conteúdo mitocondrial e tamanho de célula (razões das velocidades das taxas respiratórias): V_{ADP}/V_{OLIGO} (representa a capacidade de fosforilação acoplada) aumentou 44%, sem diferença estatística; enquanto, a razão V_{OLIGO}/V_{CCCP} (representa o desacoplamento ou vazamento de prótons como uma fração da capacidade do sistema de transporte de elétrons), reduziu 42% ($p < 0,05$). Estes resultados indicam aumento do grau de acoplamento na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria após o treinamento físico, aumentando a eficiência mitocondrial em tecido adiposo branco (**Figura 18**). Estes parâmetros mitocondriais estão frequentemente associados com a atividade das proteínas desacopladoras (UCPs). A expressão gênica da *UCP1* foi reduzida após o treinamento físico (**Figura 19**).

Figura 18. Conteúdo e respiração mitocondrial em tecido adiposo branco de mulheres com obesidade pré e pós treinamento físico.

(A) V_{ADP} : taxa de respiração em estado de fosforilação;

(B) V_{OLIGO} : taxa de respiração em estado de não fosforilação;

(C) V_{CCCP} : taxa de respiração em estado não acoplado;

(D) V_{ADP}/V_{OLIGO} : relação do controle de fluxo respiratório, acoplado;

(E) V_{OLIGO}/V_{CCCP} : relação do controle de fluxo respiratório, desacoplado;

(F) CS: atividade da enzima citrato sintase.

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Símbolos pretos indicam valores “pré intervenção”.

Símbolos brancos indicam valores “pós intervenção”.

Figura 19. Expressão gênica de *UCPI* em tecido adiposo branco de mulheres com obesidade após treinamento físico.

Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Símbolos pretos indicam valores “pré intervenção”.

Símbolos brancos indicam valores “pós intervenção”.

N= 9 participantes.

5.5 Correlações entre os indicadores mitocondriais, composição corporal e desempenho físico

Foi encontrado correlações entre TMR e MLG ($r = 0.552$, $p = 0.002$), mostrando a importância da massa magra sobre a manutenção da TMR (**Figura 20**). A TMR e oxidação lipídica foi inversamente correlacionada com a respiração mitocondrial desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP}), mas positivamente correlacionada com atividade da enzima CS (**Tabela 4**). Além disso, o QR foi positivamente correlacionado com a respiração mitocondrial desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP}) e inversamente com CS, assim como oxidação de carboidrato que também foi inversamente correlacionado com CS. Estes resultados indicam que a densidade mitocondrial e o grau de acoplamento em TAB são importantes componentes da TMR e oxidação lipídica. Quanto ao desempenho físico, V_{max} apresenta correlação positiva com a enzima CS e negativa com a respiração mitocondrial desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP}). Ainda, foi encontrada correlação positiva entre V_{max} com TMR e oxidação lipídica, e uma correlação inversa com QR e oxidação de carboidrato (**Tabela 4**). Demonstrando os efeitos do treinamento físico sobre o metabolismo energético.

Figura 20. Coeficiente de Correlação entre Taxa metabólica de repouso (TMR) e massa livre de gordura (MLG).

Amostras de pré e pós intervenção. N= 14 sujeitos, totalizando 28 amostras.

Números indicam os participantes.

Símbolos pretos: pré intervenção.

Símbolos brancos: pós intervenção.

Tabela 4. Coeficiente de correlação entre Vmax, fosforilação desacoplada (Pearson) e enzima CS (Spearman) com indicadores corporais.

	Vmax (km/h)		Fosforilação desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP})		Enzima CS (nmol/min/mg)	
	r	p	r	p	r	p
TMR (Kcal/dia)	0,375	0,049	-0,513	0,005	0,422	0,025
Oxidação lipídica (g/dia)	0,521	0,004	-0,549	0,003	0,605	0,001
Oxidação CHO (g/dia)	-0,473	0,011	0,303	n.s	-0,460	0,011
QR (V_{CO_2}/V_{O_2})	-0,550	0,002	0,382	0,045	-0,538	0,003
Vmax (km/h)	-	-	-0,530	0,004	0,581	0,001
Enzima CS (nmol/min/mg)	0,581	0,001	-0,696	<0,0001	-	-
Fosforilação desacoplada (V_{OLIGO}/V_{CCCP})	-0,530	0,004	-	-	-0,696	<0,0001

TMR: taxa metabólica de repouso. Oxidação CHO: oxidação de carboidrato. QR: coeficiente respiratório. Vmax: velocidade máxima (desempenho aeróbio). Enzima CS: atividade da enzima citrato sintase. N= 14 sujeitos (amostras misturadas entre antes e depois da intervenção, totalizando 28 amostras). n.s: não significativo.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou que o treinamento físico de 8 semanas foi suficiente para aumentar a TMR, a oxidação lipídica, o desempenho físico, o conteúdo mitocondrial e reduzir os fatores de risco de doenças cardiovasculares (TMAO, ceramidas e esfingomielina). Também foi detectada a redução do índice de adiposidade corporal, independente da mudança de composição corporal ou perda de peso.

De maneira semelhante, Kong et al., (2016), não encontrou alteração na composição corporal de mulheres com sobrepeso e obesidade após 5 semanas de treinamento aeróbio intervalado e contínuo, porém, encontrou incremento na capacidade aeróbia como no presente estudo. Por outro lado, Ferreira et al., (2016) encontrou redução significativa nas variáveis de composição corporal de mulheres com sobrepeso e obesidade após 10 semanas de treinamento resistido em circuito. Resultados similares são descritos por Tan et al. (2016) após 10 semanas de treinamento aeróbio intenso em mulheres com sobrepeso com idade de 45 a 60 anos. Estes autores sugerem que quanto maior o tempo de treinamento maior a mudança na composição corporal. Desta maneira a manutenção de peso nos pacientes do presente protocolo pode ser explicada pelo tempo de treinamento, considerado insuficiente para perda de peso. No entanto é importante ressaltar que independente da perda de peso, houve aumento da oxidação de lipídios e redução da oxidação de carboidratos.

O presente trabalho mostrou que houve incremento de desempenho físico e diminuição de fatores relacionados à comorbidades que cursam com menor qualidade de vida. Corroborando com Crump et al., 2017, que apresenta baixa aptidão física como fatores de risco para doenças associadas a obesidade. Dessa maneira, o exercício físico e aumento de desempenho físico atuam reduzindo comorbidades associadas a obesidade (KENNEDY et al., 2018; FETT et al., 2009).

Uma revisão sistemática mostrou os efeitos do exercício físico em marcadores inflamatórios. O exercício físico protege contra o desenvolvimento de aterosclerose e maior resistência à insulina. Quanto maior a duração e frequência nos treinamentos físicos, maior a redução da inflamação sistêmica (HAYASHINO et al., 2014). Enquanto, Zhang et al., (2017), mostrou que treinamentos de alta intensidade e curta duração são melhores do que treinamento aeróbio contínuo de intensidade moderada para reduzir adiposidade abdominal. Loprinzi (2015), mostrou que em adultos, utilizar a atividade física moderada à vigorosa é mais importante do que volume de exercícios na redução de inflamação sistêmica. Outra revisão mostrou a redução na inflamação sistêmica e melhoras em aspectos como depressão e sono, após treinamento físico

combinado (exercícios aeróbios e exercício de força) (ZDZIARSKI et al., 2015). Dessa maneira, a prática de atividade física habitual tem sido mostrada como característica fundamental na prevenção primária e secundária de saúde, com evidências de menor ocorrência de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, obesidade e alguns tipos de câncer (WARBURTON et al., 2007). Os efeitos do exercício físico como proteção de doenças podem ser diversos, independente do tipo, frequência, intensidade e volume do treinamento.

Em nosso estudo, o treinamento físico também atuou como protetor à possíveis doenças, uma vez que observamos a redução da TMAO plasmática após a intervenção independente do aumento de seu precursor (colina). Entretanto, a resposta do exercício sobre os níveis de TMAO permanece controversa, pois, Wang et al., (2015) encontrou aumento de TMAO em amostras de urina após treinamento físico intenso. Enea et al., (2010), não encontrou diferença nos níveis séricos de TMAO entre pré e pós exercício em pessoas sedentárias e ativas; enquanto, Zhang et al., (2017), mostrou em animais, que a elevação do TMAO foi inibida com o exercício físico, assim como no nosso estudo.

Os níveis de TMAO no plasma são mais elevados (40 $\mu\text{mol/L}$) em pessoas com doença renal crônica (KOETH et al.; 2013), enquanto, em pessoas com insuficiência cardíaca têm concentração entre 6 e 8 $\mu\text{mol/L}$. Estas possuem alto risco de futuros eventos cardiovasculares adversos (TANG et al., 2014). Em pessoas saudáveis, os níveis de TMAO variam entre 1 e 6 $\mu\text{mol/L}$, tendo como média 3 $\mu\text{mol/L}$ (TANG et al., 2013; KOETH et al.; 2013). Em nosso estudo, os níveis de TMAO chegaram a média de 5 $\mu\text{mol/L}$ após a intervenção.

O TMAO é considerado um fator de risco de doenças cardiovasculares e está positivamente associado com adiposidade (HEIANZA et al., 2018). O aumento plasmático de TMAO está associado com doenças relacionadas ao distúrbio do metabolismo energético, como diabetes e insuficiência cardíaca (TANG et al., 2015; TROSEID et al., 2015). Em análise de mitocôndria cardíaca, Makrecka-Kuka et al., (2017), encontrou que o TMAO reduz a oxidação do piruvato e ácidos graxos na mitocôndria, além de reduzir o fluxo de substratos e prejudicar a β -oxidação.

Outras variáveis analisadas e relacionadas à adiposidade, as ceramidas e esfingomielinas, também reduziram após a intervenção de treinamento físico. A elevação de ceramidas no plasma tem sido relacionada à obesidade, a maior resistência à insulina e maior ocorrência de doenças cardiovasculares (CHAVEZ; SUMMERS,

2012). Em específico as ceramidas (Cer 16:0) têm sido descritas como aumentadas em pessoas com obesidade e podem estar associadas negativamente com a sensibilidade à insulina e gasto energético corporal (TURPIN et al., 2014; RAICHUR et al., 2014). Assim como a Cer 16:0, ou a Cer 18:0 também foram associadas com maior resistência a insulina, quando analisadas em músculo esquelético (BAJPEYI et al., 2014). Da mesma maneira que os níveis de ceramidas no plasma foram correlacionados com maiores valores de IMC (WEIR et al., 2013; MAMTANI et al., 2014). Os níveis elevados de ceramidas também está associado ao aumento na fome e ganho de peso corporal, uma vez que são mediadores na sinalização de grelina e leptina no hipotálamo (RAMÍREZ et al., 2013).

Estudos têm mostrado os níveis de ceramidas são responsivos à intervenções com exercício físico, analisados em plasma, tecido adiposo ou músculo esquelético (KASUMOV et al., 2015; SOLOMON et al., 2008; HELGE et al., 2004; AMATI et al., 2011). Corroborando com os nossos achados, onde encontramos reduções dos ceramidas Cer 16:0, Cer 18:0 e Cer 22:0, considerados os ceramidas mais abundantes em plasma (KASUMOV et al., 2015). Enquanto isso, o único lipídio que aumentou após o treinamento físico, foi o esfingosina-1-fosfato (S1P), seguindo a mesma direção do estudo de Baranowski et al. (2011) que mostra aumento de S1P no plasma de 20 homens saudáveis após sessões de treinamento físico aeróbio. O mesmo resultado encontrado por Ksiazek et al. (2018), em 30 homens saudáveis após 8 semanas de treinamento físico aeróbio. Acredita-se que o S1P está ligado com a lipoproteína de alta densidade (HDL) e albumina, assim, seu aumento pode ser um mecanismo com propriedades cardioprotetivas e estão relacionados aos benefícios dos efeitos do exercício físico nas doenças cardiovasculares (ALEWINJNSE; PETERS, 2008; HOOFNAGLE et al., 2010). Nossos dados sugerem que Cer16:0 Cer 18:0 Cer22:0 e S1P poderiam ser indicadores de presença ou não de risco cardiovascular.

Os ceramidas também desenvolvem papel importante no metabolismo dos esfingolipídios, que podem ser convertidos em esfingomielina (SM), que seguindo na síntese hepática, é incorporada à lipoproteína de baixa densidade (VLDL) (OOI et al., 2008). Normalmente, esfingomielinas são acumuladas em placas ateroscleróticas em humanos, uma vez que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) está presente nas placas ateroscleróticas e possuem altos níveis de esfingomielina (KANG et al., 2013). Assim como em nosso estudo encontramos redução em várias classes de esfingomielina, Bergman et al., (2015) mostram que atletas possuem menor concentração de

esfingomielina quando comparados com obesos e pessoas com diabetes melitos tipo 2. Da mesma maneira, estudos em ratos encontraram que o treinamento afeta a função de esfingomielina em músculo e provoca sua redução (DOBRZYN; GORSKI, 2002), de maneira similar ao encontrado no presente estudo.

Nossos resultados também mostram que o exercício físico promove adaptações metabólicas no TAB das mulheres com obesidade, assim como em estudo com animais (STANFORD et al., 2015). O exercício físico causa diversos efeitos em genes envolvidos no metabolismo do tecido adiposo, como a biogênese mitocondrial e aumento de consumo de oxigênio mitocondrial (STANFORD et al., 2015). O controle dinâmico da biogênese e da função respiratória das mitocôndrias depende principalmente do receptor ativador do proliferador de peroxissomo e co-ativador-1 α (PGC-1 α), que é ativado e aumentado pelo exercício físico, aumentando assim a β -oxidação mitocondrial (PARDO et al., 2011). O fim do produto da β -oxidação, acetil-CoA, entra no ciclo de ácido cítrico através da atividade da enzima Citrato Sintase (CS), um biomarcador de densidade mitocondrial (LARSEN et al., 2012). Mostramos que após 8 semanas do treinamento físico, houve aumento da capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial e grau de acoplamento (redução da fosforilação desacoplada) do TAB e aumento da densidade mitocondrial (CS) e redução da expressão de UCP1. Todos estes indicando melhor qualidade de vida, ou menor risco cardiovascular, ou maior consumo energético, como encontrado por nós.

Este efeito parece ser dependente do tempo de intervenção, uma vez que o estudo realizado por Camera et al., 2010 mostrou que após 10 dias de exercício de corrida, houve mudança da oxidação de carboidratos para a oxidação de lipídios durante exercício submáximo, mas não foram encontradas alterações nos marcadores oxidativos no TAB subcutâneo (CAMERA et al., 2010), assim como não houve mudança na capacidade oxidativa do TAB em sujeitos saudáveis e não treinados, mesmo após 6 a 12 semanas de treinamento (LARSEN et al., 2015; VOSSelman et al., 2015). Mas em portadores de obesidade e após 18 meses de cirurgia bariátrica, foi encontrada aumento da respiração mitocondrial e capacidade de fosforilação junto com a perda de peso (HANSEN et al., 2015). Assim como no TAB, a cirurgia bariátrica aumenta o acoplamento na fosforilação oxidativa e geração de ATP em músculo esquelético (FERNSTRÖN et al., 2016), um efeito conhecido do treinamento físico nesse tecido (PERRY et al., 2010; DAUSSIN et al., 2008; BURGOMASTER et al., 2008), sugerindo uma ligação metabólica entre estes órgãos, ou que os efeitos da cirurgia bariátrica estão

relacionados a mudança para um estilo de vida menos sedentário. Estudo em músculo esquelético mostra que a respiração mitocondrial é menor em indivíduos com obesidade quando comparados com o peso normal (RITOV et al, 2010). No presente trabalho não foram analisadas mitocôndrias de tecido muscular, pois a hipótese de trabalho se referia ao estudo de mitocôndrias do tecido adiposo.

Ainda, observamos a associação positiva da TMR e massa livre de gordura, como já mostrado na literatura (DAVIS et al., 2017). Além de que, a TMR e oxidação lipídica estão associadas, em nosso trabalho, com os incrementos na densidade mitocondrial e grau de acoplamento. Efeitos que podem ser promovidos pelo treinamento físico, assim como, reduções no tamanho dos adipócitos e no conteúdo lipídico, mudanças na expressão de proteínas e liberação de citocinas, como descrito por diferentes autores (STANFORD et al., 2015; TREVELLIN et al., 2014). Além disso, aumentos na capacidade mitocondrial no TAB podem aumentar a oxidação lipídica (CUMMINS et al., 2014). Confirmamos esses dados, a partir da redução do QR com predominância da oxidação lipídica (FASSINI et al., 2015).

As alterações mitocondriais aqui encontradas no TAB também foram associadas ao maior desempenho físico. Estes são efeitos bem estabelecidos do exercício no músculo esquelético, em que a atividade da enzima CS correlacionou-se positivamente com o V_{O_2} máx (VIGELSO et al., 2014; GUADALUPE-GRAU et al., 2018), número de mitocôndrias, volume, conteúdo enzimático e capacidade respiratória que aumentaram linearmente em resposta ao treinamento, e, estão elevados em indivíduos treinadas quando comparados a indivíduos destreinados (PERRY et al., 2010; LANZA et al., 2008; LARSEN et al., 2009).

Em nosso estudo, encontramos o aumento do conteúdo mitocondrial, do gasto energético de repouso, do desempenho físico e da oxidação de lipídios, além das associações destes indicadores com a função mitocondrial. Também é importante ressaltar que houve redução de fatores de risco associados a doenças cardiovasculares. Assim ratificamos, que o foco deste estudo foi analisar o efeito do treinamento físico nas variáveis mitocondriais de tecido adiposo, e fatores de risco de doenças associados a obesidade. Consideramos importante mostrar as alterações metabólicas e físicas que exercício físico induz independente da mudança da composição corporal. Os resultados encontrados evidenciam o fato de que o tratamento da obesidade (perda de peso e redução da gordura corporal) não deve ser centrado em aumento da atividade física isoladamente, e sim, composto por um conjunto de atividades multiprofissionais.

7. CONCLUSÃO

O treinamento físico combinado (alternando 30 segundos de força e 30 segundos de caminhada/corrída, 3 vezes / semana, 55 min / dia, 75 a 90% da FC máxima e RM) com duração de 8 semanas melhorou a capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial, aumentou a densidade mitocondrial e grau de acoplamento no TAB de mulheres com obesidade. Essas alterações estão relacionadas à incrementos no desempenho físico, na taxa metabólica de repouso e na oxidação lipídica, independente da perda de peso corporal.

Apesar do tempo do treinamento físico não ter sido suficiente para ocorrer perda de peso ou mudança de composição corporal, foi suficiente para reduzir fatores relacionados a saúde e preditores de doenças cardiovasculares, como o TMAO. Além, de provocar redução de 11 lipídios (dos 19 analisados) da classe de esfingolipídios.

Concluí-se que independente da perda de peso, o treinamento físico pode provocar alterações no metabolismo energético, mitocondrial, lipídico e físico, permitindo redução e proteção de comorbidades relacionadas a obesidade.

8. *REFERÊNCIAS*

ACSM, American College of Sports Medicine. U.S. Department of Health and Human Services. 2008 Physical Activity Guidelines for Americans [Internet]. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services; 2008 Disponível em: <https://health.gov/paguidelines/pdf/paguide.pdf>.

ALEMAN-MATEO, H.; RUSH, E.; ESPARZA-ROMERO, J.; et al. Prediction of fat-free mass by bioelectrical impedance analysis in older adults from developing countries: a cross-validation study using the deuterium dilution method. *Journal of Nutrition Health and Aging*, v. 14, p. 418-426, 2010.

AMATI, F.; DUBE, J. J.; ALVAREZ-CARNERO, E.; et al. Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes*, v. 60, p. 2588-2597, 2011.

BAJPEYI, S.; MYRLAND, C. K.; COVINGTON, J. D.; et al. Lipids in skeletal muscle myotubes is associated to the donors' insulin sensitivity and physical activity phenotypes. *Obesity*, v. 22, p. 426-434, 2014.

BARBAGALLO, I.; VANELLA, L.; CAMBRIA, M. T.; et al. Silibinin regulates lipid metabolism and differentiation in functional human adipocytes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 6, p. 3-9, 2016.

BARANOWSKI, M.; CHARMAS, M.; DLUGOLECKA, B.; GÓRSKI, J. Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiology*, v. 203, p. 373-380, 2011.

BENNETT, B. J.; DE AGUIAR VALLIM, T. Q.; WANG, Z.; et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metabolism*, v. 17, p. 49-60, 2013.

BERGMAN, B. C.; BROZINICK, J. T.; STRAUSS, A.; et al. Serum sphingolipids: relationships to insulin sensitivity and changes with exercise in humans. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 309, p. E398-E408, 2015.

BERGSTRÖM, G.; BEHRE, C.J.; SCHMIDT, C. Moderate intensities of leisure-time physical activity are associated with lower levels of high-sensitivity C reactive protein in healthy middle-aged men. *Angiology*, v. 63, p. 412-415, 2012.

BERNARD, G.; FAUSTIN, B.; PASSERIEUX, E.; et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, v. 291, p. C1172-C1182, 2006.

BIKMAN, B. T.; SUMMERS, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, p. 4222-4230, 2011.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, p. 9-19, 2012.

BISWAS, A.; OH, P. I.; FAULKNER, G. E. Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*, v. 162, p. 123-132, 2015.

BONDIA-PONS, I.; MAUKONEN, J.; MATTILA, I.; et al. Metabolome and fecal microbiota in monozygotic twin pairs discordant for weight: a Big Mac challenge. *FASEB Journal*, v. 28, p. 4169-4179, 2014.

- BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 68, p. 701–711, 2012.
- BORG, G. Subjective effort in relation to physical performance and working capacity. In: *Psychology: From Research to Practice*. Pick HL Jr, (Ed): New York, Plenum Publishing Corp, 1978, p. 333-361.
- BORODZICZ, S, CZARZASTA, K.; KUCH, M.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis*, v. 14, p. 55-63, 2015.
- BOUILLAUD, F.; COUPLAN, E.; PECQUER, C.; RICQUIER, D. Homologues of the uncoupling portein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1, UCP4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1505, p. 107-119, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, v. 435, p. 297–312, 2011.
- BRAY, G. A.; BOUCHARD, C. *Handbook of Obesity: Epidemiology, etiology and physiopathology*. 3rd ed. New York: Informa. p. 1-28, 2008.
- BROOKS, G. A.; BUTTE, N. F.; RAND, W. M. Chronicle of the Institute of Medicine physical activity recommendation: how a physical activity recommendation came to be among dietary recommendations. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 921S-930S, 2004.
- BRZYCKI, M. Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*, v. 64, p. 88-90, 1993.
- BURGOMASTER, K. A.; HOWARTH, K. R.; PHILLIPS, S. M.; et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *Journal of Physiology*, v. 586, p. 151–160, 2008.
- CAMERA, D. M.; ANDERSON, M. J.; HAWLEY, J. A.; CAREY, A. L. Short-term endurance training does not alter the oxidative capacity of human subcutaneous adipose tissue. *Euroupen Journal Applied of Physiology*, v. 109, p. 307-316, 2010.
- CAMONT, L.; LHOMME, M.; RACHED, F.; LE GOFF, W.; et al. Small, dense high-desinty lipoprotein-3 particules are enriched in negatively charged phospholipds: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antuthrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 33, p. 2715-2723, 2013.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiology significance. *Physiology Reviews*, v. 84, p. 277-359, 2004.
- CARDINAL, B. J.; PARK, E. A.; KIM, M.; CARDINAL, M. K. If exercise is medicine, where is exercise in medicine? Review of U.S. medical education curricula for physical activity-related content. *Journal of Physical Activity and Health*, v. 12, p. 1336–1343, 2015.
- CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 15, p. 585-594, 2012.

- CHO, C. E.; CAUDILL, M. A. Trimethylamine-N-oxide: friend, foe, or simply caught in the cross-fire? *Trends Endocrinology Metabolism*, v. 28, p. 121–130, 2017.
- CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 10, p. 319-324, 2004.
- CONCEIÇÃO, A.; SILVA, A.J.; BARBOSA, T.; et al. Neuromuscular fatigue during 200 m breaststroke. *Journal Sports Science Medicine*, v. 13, p. 200-210, 2014.
- CROYAL, M.; KAABIA, Z.; LEÓN, L.; et al. Fenofibrate decreases plasma ceramide in type 2 diabetes patients: A novel marker of CVD? *Diabetes & Metabolism*, v. 44, p. 143-149, 2018.
- CRUMP, C.; SUNDQUIST, J.; WINKLEBY, M. A.; et al. Interactive effects of obesity and physical fitness on risk of ischemic heart disease. *International Journal of Obesity*, v. 41, p. 255–261, 2017.
- CUMMINS, T. D.; HOLDEN, C. R.; SANSBURY, B. E., et al. Metabolic remodeling of white tissue in obesity. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 307, p. E262-E277, 2014.
- CURTIS, J. M.; GRIMSRUD, P. A.; WRIGHT, W. S.; et al. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *Diabetes*, v. 59, p. 1132–1142, 2010.
- DAUSSIN, F. N.; ZOLL, J.; PONSOT, E.; et al. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *Journal Applied Physiology*, v. 104, p. 1436–1441, 2008.
- DAVIS, R. A. H.; HALBROOKS, J. E.; WATKINS, E. E.; et al. High-intensity interval training and calorie restriction promote remodeling of glucose and lipid metabolism in diet-induced obesity. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 313, p. E243-E256, 2017.
- DE PAUW, A.; TEJERINA S.; RAES, M.; et al. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *The American Journal of Pathology*, v. 175, p. 927-939, 2009.
- DOBRYN, A.; GORSKI, J. Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: Content and composition. Effect of prolonged exercise. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 282, p. E277–E285, 2002.
- DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. *Ciências Nutricionais: aprendendo a aprender*. São Paulo: Savier (2 Ed). 2008, pp. 87-95.
- ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins – what is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, p. 1351-1371, 2007.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and molecular regulation of skeletal muscle adaptations. *Cell Metabolism*, v. 17, p. 168-184, 2013.
- ENEA, C. ; SEQUIN, F.; PETITPAS-MULLIEZ, J.; et al. H NMR-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after acute and chronic physical exercise. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, p. 1167–1176, 2010.
- FASSINI, P. G.; SILVAH, J. H.; LIMA, C. M. M.; et al. Indirect Calorimetry: From Expired CO₂ Production, Inspired O₂ Consumption to Energy Equivalent. *Journal of Obesity Weight Loss Therapy*, v. S5, p. 001-003, 2015.

- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; et al., Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 3117-3132, 2011.
- FERNSTRÖN, M.; BAKKAMN, L.; LOOGNA, P.; et al. Improved Muscle Mitochondrial Capacity Following Gastric Bypass Surgery in Obese Subjects. *Obesity Surgery*, v. 26, p. 1391-1397, 2016.
- FERREIRA, F. C.; BERTUCCI, D. R.; BARBOSA, M. R.; et al. Circuit resistance training in women with normal weight obesity syndrome: body composition, cardiometabolic and echocardiographic parameters, and cardiovascular and skeletal muscle fitness. *Journal Sports Medicine Physical and Fitness*, v. 57, p. 1033-1044, 2016.
- FETT, C. A.; FETT, W. C. R.; MARCHINI, J. S. Level of Overweight/Obese Women After 08 Weeks of Aerobic or Mixed Metabolism Exercises. *Revista Brasileira Cineantropometria e Desempenho Humano*, v. 11: p. 261-266, 2009.
- FIUZA-LUCES, C.; GARATACHEA, N.; BERGER, N. A.; LUCIA, A. Exercise is a the real polypill. *Physiology, Bethesda*, v. 28, p. 330-358, 2013.
- FLEGAL, K. M.; GRAUBARD, B. I.; WILLIAMSON, D. F.; GAIL, M. H. Cause-specific excess death associated with underweight, overweight and obesity. *JAMA*, v. 298, p. 2028-2037, 2007.
- FLETCHER, G. F.; FLIPSE, T. R.; OKEN, K. R. Exercise and the cardiovascular system. In Fuster V, Alexander W, O'Rourke RA (eds): *Hurst's the heart*. 11 ed. New York McGraw-Hill, 2004.
- FOSTER, C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. *Medicine Science Sports and Exercise*, v. 30, p. 1164-1168, 1998.
- FRAYN, K. N. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *Journal Applied of Physiology*, v. 55, p. 628-634, 1983.
- FROHNERT, B. I.; BERNLOHR, D. A. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Advances in Nutrition*, v. 4, p. 157-163, 2013.
- FUTERMAN, A. H.; HANNUN, Y. A. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Reports*, v. 5, p. 777-782, 2004.
- GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ, *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 316, p. 129-139, 2010.
- GIRALT, M.; VILLARROYA, E. White, brown, veige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, v. 154, p. 2992-3000, 2013.
- GOLLISCH, K. S.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N.; et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Americam Journal of Physiology, Endocrinoly and Metabolism*, v. 297, p. E495-504, 2009.
- GOMES, L. C.; DI BENEDETTO, G.; SCORRANO, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology*, v. 13, p. 589-598, 2011.
- GRANATA, C.; JAMNICK, N. A.; BISHOP, D. J. Principles of exercise prescription, and how they influence exercise-induced changes of transcription factors and other regulators of mitochondrial biogenesis. *Sports Medicine*, v. 48, p. 1541-1559, 2018.

- GUADALUPE-GRAU, A.; FERNÁNDEZ-ELÍAS, V. E.; ORTEGA, J. F.; et al. Effects of 6-month aerobic interval training on skeletal muscle metabolism in middle-aged metabolic syndrome patients. *Scandinavian Journal of Medicine Science in Sports*, v. 28, p. 585-595, 2018.
- GUYTON, J. R.; KLEMP, K. F. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 16, p. 4-11, 1996.
- HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. The adipocyte as an endocrine cell, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, v. 37, p. 753-768, 2008.
- HAMMAD, S. M.; AL GADBAN, M. M.; SEMLER, A. J.; KLEIN, R. L. Sphingosine 1-phosphate distribution in human plasma: associations with lipid profiles. *Journal of Lipids*, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- HAMMAD, S. M.; PIERCE, J. S.; SOODAVAR, F.; et al. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *Journal of Lipid Research*, v. 51, p. 3074-3087, 2010.
- HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 139-150, 2008.
- HANSEN, M.; LUND, M. T.; GREGERS, E.; et al. Adipose tissue mitochondrial respiration and lipolysis before and after a weight loss by diet and RYGB. *Obesity*, v. 23, p. 2022-2029, 2015.
- HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. *Cell*, v. 159, p. 738-749, 2014.
- HAYASHINO, Y.; JACKSON, J. L.; HIRATA, T.; et al. Effects of exercise on C-reactive protein, inflammatory cytokine and adipokine in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism – Clinical and Experimental*, v. 63, p. 431-440, 2014.
- HEIANZA, Y.; SUN, D.; SMITH, S. R.; et al. Changes in gut microbiota-related metabolites and long-term successful weight loss in response to weight-loss diets: the pounds lost trial. *Diabetes Care*, v. 41, p. 413-419, 2018.
- HELGE, J. W.; DOBRZYN, A.; SALTIN, B.; GORSKI, J. Exercise and training effects on ceramide metabolism in human skeletal muscle. *Experimental Physiology*, v. 89, p. 119-127, 2004.
- HOOFNAGLE, A. N.; VAISAR, T.; MITRA, P.; CHAIT, A. HDL lipids and insulin resistance. *Current Diabetes Reports*, v. 10, p. 78-86, 2010.
- HOLLAND, W. L.; BIKMAN, B. T.; WANG, L. P.; et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the pro inflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, p. 1858-1870, 2011.
- HOLLOSZY, J. O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 59, p. 5-18, 2008.
- HOUMARD, J. A. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 294, p. R1111-R1116, 2008.

- HU, C.; HOENE, M.; ZHAO, X.; et al. Lipidomics analysis reveals efficient storage of hepatic triacylglycerides enriched in unsaturated fatty acids after one bout of exercise in mice. *PLoS One*, v. 5, p. e13318, 2010.
- ICHIMURA, Y.; KIRISAKO, T.; TAKAO, T.; et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, v. 408, p. 488–492, 2000.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Introducción a la determinación de la composición corporal mediante la técnica de dilución de deuterio con análisis de muestras de orina por espectrometría de masas de relación isotópica, IAEA Human health series, n. 13, Vienna, 2013.
- IQBAL, J.; WALSH, M. T.; HAMMAD, S. M.; HUSSAIN, M. M. Sphingolipids and lipoproteins in health and metabolic disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 28, n. 7, p. 506-518, 2017.
- JASTROCH, M.; DIVAKARUNI, A. S.; MOOKERJEE, S.; et al. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry*, v. 47, p. 53-67, 2010.
- JIANG, X. C.; PAULTRE, F.; PEARSON, T. A.; et al. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 20, p. 2614-2618, 2000.
- JOHANNSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. The role of mitochondria in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, p. 780-786, 2009.
- JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological. Reviews*, v. 249, p. 218–238, 2012.
- JULIAN, V.; THIVEL, D.; COSTES, F.; et al. Eccentric training improves body composition by inducing mechanical and metabolic adaptations: a promising approach for overweight and obese individuals. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 10-13, 2018.
- KANG, S. C.; KIM, B. R.; LEE, S. Y.; PARK, T. S. Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation. *Frontiers Endocrinology, Lausanne*, v. 4, p. 67-78, 2013.
- KASUMOV, T.; LI, L.; LI, M.; et al. Ceramide as a mediator of non-alcoholic fatty liver disease and associated atherosclerosis. *Plos One*, v. 10, p. e0126910, 2015.
- KENNEDY, A. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Fitness or fatness: which is more important? *JAMA*, v. 319, p. 231-232, 2018.
- KIKUSATO, M.; FURUKAWA, K.; KAMZONO, T.; et al. Roles of mitochondrial oxidative phosphorylation and reactive oxygen species generation in the metabolic modification of avian skeletal muscle. *Proceedings Japan Society Animal Nutrition Metabolism*, v. 60, p. 57-68 2016.
- KIM, M.; GOTO, T.; YU, R.; et al. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1-12, 2015.
- KLEIN, S.; BURKE, L. E.; BRAY, G. A.; et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: A statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation*, v. 110, p. 2952-2967, 2004.

- KOETH, R. A.; LEVISON, B. S.; CULLEY, M. K.; et al. Gamma-butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metabolism*, v. 20, p. 799–812, 2014.
- KOETH, R. A.; WANG, Z.; LEVISON, B. S.; et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, v. 19, p. 576–585, 2013.
- KOH, E. H.; PARK, J. Y.; PARK, H. S.; et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes*, v. 56, p. 2973–2981, 2007.
- KOLAK, M.; WESTERBACKA, J.; VELAGAPUDI, V. R.; et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes*, v. 56, p. 1960–1968, 2007.
- KONG, Z.; FAN, X.; SUN, S.; et al. Comparison of high-intensity interval training and moderate-to-vigorous continuous training for cardiometabolic health and exercise enjoyment in obese young women: a randomized controlled trial. *PLoS One*, v. 11, p. e0158589, 2016.
- KRAUNSOE, R.; BOUSHEL, R.; HANSEN, C. N.; et al. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *Journal of Physiology*, v. 588, p. 2023–2032, 2010.
- KSIAZEK, M.; CHACIŃSKA, M.; CHABOWSKI, A.; BARANOWSKI, M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of Lipids Research*, v. 56, p. 1271–1281, 2015.
- KSIAZEK, M.; CHARMAS, M.; KLUSIEWICZ, A.; et al. Endurance training selectively increases high-density lipoprotein-bound sphingosine-1-phosphate in the plasma. *Scandinavian Journal Medicine Science in Sports*, v. 28, p. 57–64, 2018.
- KUIPERS, H.; VERSTAPPEN, F. T.; KEIZER, H. A.; et al. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. *international journal of Sports Medicine*, v. 6, p. 197–201, 1985.
- KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol & Metabolism*, v. 23, p. 435–443, 2012.
- LANDI, F.; MARZETTI, E.; MARTONE, A.M.; et al. Exercise as a remedy for sarcopenia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 17, p. 25–31, 2014.
- LANZA, I. R.; SHORT, D. K.; SHORT, K. R.; et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*, v. 57, p. 2933–2942, 2008.
- LARSEN, R. G.; CALLAHAN, D. M.; FOULIS, S. A.; KENT-BRAUN, J. A. In vivo oxidative capacity varies with muscle and training status in young adults. *Journal Applied Physiology*, v. 107, p. 873–879, 2009.
- LARSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, C. N.; et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *Journal of Physiology*, v. 590, p. 3349–3360, 2012.
- LARSEN, S.; DANIELSEN, J. H.; SONDERGARD, S. D.; et al. The effect of high-intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Scand Journal of Medicine Science in Sports*, v. 25, p. e59–e69, 2015.

- LAUGHLIN, M. H.; ROSEGUINI, B. Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: Differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 59, p. 71-88, 2008.
- LEAKSONEN, R.; EKROOS, K.; SYSI-AHO, M.; et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *European Heart Journal*, v. 37, p. 1967-1976, 2016.
- LI, X. S.; OBEID, S.; KLINGENBERG, R.; et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *European Heart Journal*, v. 38, p. 814-824, 2017.
- LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism*, v. 17, p. 491-506, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOGAN, D. C. The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 1225-1243, 2006.
- LOPRINZI, P. D. Frequency of moderate-to vigorous physical activity (MVPA) is a greater predictor of systemic inflammation than total weekly volume of MVPA: implications for physical activity promotion. *Physiology & Behavior*, v. 141, p. 46-50, 2015.
- LUNA-LUNA, M.; MEDINA-URRUTIA, A.; VARGAS-ALARCÓN, G.; et al. Adipose tissue in metabolic syndrome: onset and progression of atherosclerosis. *Archives of Medical Research*, v. 46, p. 392-407, 2015.
- MAJOR, G. C.; DOUCET, E.; TRAYHURN, P.; et al. Clinical significance of adaptive thermogenesis. *International Journal Obesity*, v. 31, p. 204-212, 2007.
- MAKRECKA-KUKA, M.; VOLSKA, K.; ANTONE, U.; et al. Trimethylamine N-oxide impairs pyruvate and fatty acid oxidation in cardiac mitochondria. *Toxicology letters*, v. 267, p. 32-38, 2017.
- MAMTANI, M.; MEIKLE, P. J.; KULKARNI, H.; et al. Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families. *Obesity*, v. 22, p. 950-956, 2014.
- MARCINKO, K.; STEINBERG, G. R. The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise. *Experimental Physiology*, v. 99, p. 1581-1585, 2014.
- MATHIS, D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metabolism*, v. 17, p. 851-859, 2013.
- MATTIASSON, G.; SULLIVAN, P. G. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 8, p. 1-38, 2006.
- MEDBO, J. I.; MAMEN, A.; HOLT OLSEN, O.; EVERTSEN, F. Examination of four different instruments for measuring blood lactate concentration. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 60, p. 367-380, 2000.

- MEDEIROS, D. M. Assessing mitochondria biogenesis. *Methods*, v. 46, p. 288–294, 2008.
- MELLO, A. H.; COSTA, A. B.; ENGEL J. D. G., TEZZA REZIN, G. T. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, v. 192, p. 26–32, 2018.
- MIKA, A.; SLEDZINSKI, T. Alterations of specific lipid groups in serum of obese humans: a review. *Obesity Reviews*, v. 18, n. 2, p. 247-272, 2017.
- MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections*, v. 4, p. R1-R15, 2014.
- MORAD, S. A.; CABOT, M. C. Ceramide orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews. Cancer*, v. 13, p. 51–65, 2013.
- MORGAN, W. P.; POLLOCK. M. L. Psychological characterization of the elite distance runner. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 301, p. 382-403, 1977.
- MUOIO, D. M.; NEUFER, P. D. Lipi-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metabolism*, v. 15, p. 595-605, 2012.
- MURIAS, J. M.; KOWALCHUK, J. M.; PATERSON, D. H. Time course and mechanisms of adaptations in cardiorespiratory fitness with endurance training in older and young men. *Journal of applied physiology*, v. 108, p. 621-627, 2010.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. *Bioenergetics 3* (London: Academic Press), 2002.
- NICKLAS, B. J.; YOU, T.; PAHOR, M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, v. 172, p. 1199–209, 2005.
- OBEID, R.; AWWAD, H. M.; RABAGNY, Y.; et al. Plasma trimethylamine N-oxide concentration is associated with choline, phospholipids, and methylmetabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 103, p. 703–711, 2016.
- OHASHI, K.; SHIBATA, R.; MUROHARA, T.; OUCHI, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 25, p. 348–355, 2014.
- OOI, E. M.; WATTS, G. F.; CHAN, D. C.; et al. Dosedependent effect of rosuvastatin on VLDL-apolipoprotein C-III kinetics in the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, v. 31, p. 1656–1661, 2008.
- OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH K. Adipokines in inflammation and metabolic disease, *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 85–97, 2011.
- PALEY, C. A.; JOHNSON, M. I. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine? *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, v. 10, p. 1-8, 2018.
- PANDOLF, K. B. Differentiate ratings of perceived exertion. *Medicine Science in Sports Exercise*, v. 14, p. 377-381, 1982.
- PARDO, R.; ENGUIX, N.; LASHERAS, J.; et al. Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in White adipose tissue is dependent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivador-1alpha. *Plos one*, v. 6, p. e26989, 2011.

- PARK, A.; KIM, W. K.; BAE, K. H. Distinction of white, beige, and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal os Stem Cells*, v. 6, p. 33-42, 2014.
- PARKER, N. D.; CRICHTON, P. G.; VIDAL-PUIG, A. J.; BRAND, M. D. Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 41, p. 335–342, 2009.
- PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. *Journal of Obesity*, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- PATTI, M. E.; CORVERA, S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, v. 31, p. 364–395, 2010.
- PERRY, C. G. R.; LALLY, J.; HOLLOWAY, G. P.; et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, v. 588, p. 4795–4810, 2010.
- PESCHECHERA, A.; ECKEL, J. “Browning” of adipose tissue – regulation and therapeutic perspectives. *Arquives of Physiology and Biochemistry*, v. 119, p. 151-160, 2013.
- PFRIMER, K.; MORIGUTI, J.C.; LIMA, N. K.; et al. Bioelectrical impedance with different equations versus deuterium oxide dilution method for the inference of body composition in healthy older persons. *Journal of Nutrition Health and Aging*, v. 16, n 2, p. 124-127, 2012.
- PINO, M. F.; PARSONS, S. A.; SMITH, S. R.; SPARKS, L. M. Active individuals have high mitochondrial content and oxidative markers in their abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity*, v. 24, p. 2467-2470, 2016.
- POLLOCK, M.L.; WILMORE, J.H.; FOX III, S.M. Exercícios na saúde e na doença – Avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. Rio de Janeiro: 1986.
- PREUGSCHAT, K.; KERSTEN, S.; ETTLE.; T, et al. Effects of feeding diets containing increasing proportions of bunt-infected wheat (*Tilletia caries*) on performance and health of pigs. *Archives of Animal Nutrition*, v. 68, p. 55–62, 2014.
- PROIA, R. L.; HLA, T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 125, p. 1379-1387, 2015.
- QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A. H.; et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of lipid research*, v. 52, p. 3299-3305, 2010.
- RAICHUR, S.; WANG, S. T.; CHAN, P. W.; CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 20, p. 687-695, 2014.
- RAMÍREZ, S.; MARTINS, L.; JACAS, J.; Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes*, v. 62, p. 2329-2337, 2013.
- RANDRIANARISOA, E.; LEHN-STEUFAN, A.; WANG, X.; et al. Relationship of Serum Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Levels with early Atherosclerosis in Humans. *Scientific Reports*, v. 6, p.1-9, 2016.
- RITOV, V. B.; MENSHIKOVA, E. V.; HE, J.; et al, Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 54, p. 8-14, 2005.

- RITOV, V. B.; MENSHIKOVA, E. V.; KELLEY, D. E. Analysis of cardiolipin in human muscle biopsy Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, v. 831, p. 63–71, 2006.
- RITOV, V. B.; MENSHIKOVA, E. V.; AZUMA, K.; et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, v. 298, p. E49-E58, 2010.
- RIVERA-BROWN, A. M.; FRONTERA, W. R. Principles of exercise physiology: responses to acute exercise and long-term adaptations to training. PM&R: The Journal of Injury, Function and Rehabilitation, v. 4, p. 797-804, 2012.
- ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sciences, v. 84, p. 705–712, 2009.
- ROHRMANN, S.; LINSEISEN, J.; ALLENSPACH, M.; et al. Plasma concentrations of trimethylamine-N-oxide are directly associated with dairy food consumption and low-grade inflammation in a German adult population. Journal of Nutrition, v. 146, p. 283–289, 2016.
- ROMANELO, V.; SANDRI, M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance. Frontiers of Physiology, v. 6, p. 1-21, 2015.
- SARIS, W. H.; BLAIR, S. N.; VAN BAAK, M. A.; et al. How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st Stock Conference and consensus statement. Obesity Reviews, v. 4, p. 101-114, 2003.
- SAMAD, F.; HESTER, K. D.; YANG G.; et al. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. Diabetes, v. 55, p. 2579-2587, 2006.
- SCHILLING, J. D.; MACHKOVECH, H. M.; HE, L.; et al. Palmitate and lipopoly saccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. Journal of. Biology Chemical, v. 288, p. 2923–2932, 2013.
- SCHISSEL, S. L.; TWEEDIE-HARDMAN, J.; RAPP, J. H.; et al. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wll sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. The Journal of Clinical Investigation, v. 98, p. 1455-1464, 1996.
- SCHOISWOHL, G.; SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; et al. Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. Journal Lipids Research, v. 51, p. 490–499, 2010.
- SCHUGAR, R. C.; SHIH, D. M.; WARRIER, M.; et al. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. Cell Reports, v. 19, p. 2451-2461, 2017.
- SCHULER, G.; ADAMS, V.; GOTO, Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. European Heart Journal, v. 34, p. 1790-1799, 2013.
- SICHERI, R.; SOUZA, R. A. Estratégias para prevenção da obesidade em crianças e adolescentes. Cadernos de Saúde Pública, v. 24, p. S209-S234, 2008.

- SILLANPAA, E.; HAKKINEN, A.; NYMAN, K.; et al. Body composition and fitness during strength and/or endurance training in older men. *Medicine Science and Sports Exercise*, v. 40, p. 950–958, 2008.
- SIMONS, R.; ANDEL, R. The effects of resistance training and walking on functional fitness in advanced old age. *Journal Aging Health*, v. 18, p. 91–105, 2006.
- SINGH, S. J.; MORGAN, M. D.; SCOTT, S.; et al. Development of a shuttle walking test of disability in patients with chronic airways obstruction. *Thorax*, v. 47, p. 1019–1024, 1992.
- SLUSE, F. E.; JARMUSZKIEWICZ, W.; NAVET, R.; et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1757, p. 480–485, 2006.
- SMITH, M.I.; YATSUNENKO, T.; MANARY, M.J.; et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*, v. 339, p. 548–554, 2013.
- SOLOMON, T. P.; SISTRUN, S. N.; KRISHNAN, R. K.; et al. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *Journal Applied Physiology*, v. 104, p. 1313–1319, 2008.
- SRERE, P. A. Citrate Synthase. *Methods in Enzymology*, v. 13, p. 3–11, 1969.
- STANFORD, K. I.; MIDDELBEEK, R. J. W.; TOWNSEND, K. L.; et al. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes*, v. 64, p. 2002–2014, 2015.
- SUBAUSTE, A. R.; BURANT, C. F. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*, v. 293, p. E159–E164, 2007.
- SUBRAMANIAM, S.; FLETCHER, C. Trimethylamine N-oxide: breathe new life. *British Journal of Pharmacology*, v. 175, n. 8, p. 1344–1353, 2017.
- SURIS, J. C.; AKRE, C.; PIGUET, C.; et al. Is Internet use unhealthy? A cross-sectional study of adolescent Internet overuse. *Swiss Medical Weekly*, v. 144, p. 1–7, 2014.
- SUTHERLAND, L. N.; BOMHOF, M. R.; CAPOZZI, L. C.; et al. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *Journal of Physiology*, v. 587, p. 1607–1617, 2009.
- SUZUKI, S.; KUBO, A.; SHINANO, H.; TAKAMA, K. Inhibition of the electron transport system in *Staphylococcus aureus* by trimethylamine-N-oxide. *Microbios*, v. 71, p. 145–148, 1992.
- TAN, S.; WANG, J.; CAO, L.; et al. Positive effect of exercise training at maximal fat oxidation intensity on body composition and lipid metabolism in overweight middle-aged women. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, v. 36, p. 225–230, 2016.
- TANG, W. H.; WANG, Z.; LEVISON, B. S.; et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, v. 368, p. 1575–1584, 2013.
- TANG, W.H.; WANG, Z.; FAN, Y.; et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 64, p. 1908–1914, 2014.

- TANG, W. H.; WANG, Z.; SHRESTHA, K.; et al. Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction, and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, v. 21, p. 91–96, 2015.
- THOMPSON, P. D.; BUCHNER, D.; PINA, I. L.; et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*, v. 107, p. 3109–3116, 2003.
- TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, v. 489, p. 242–249, 2012.
- TREMAROLI, V.; KARLSSON, F.; WERLING, M.; et al. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *cell metabolism*, v. 4, p. 228–238, 2015.
- TRENTESEAU, C.; GASTON A. T.; AGUESSE, A.; et al. Perinatal hypercholesterolemia exacerbates atherosclerosis lesions in offspring by altering metabolism of trimethylamine-n-oxide and bile acids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 37, p. 2053–2063, 2017.
- TREVELLIN, E.; SCORZETO, M.; OLIVIERI, M.; et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes*, v. 63, p. 2800–2811, 2014.
- TROSEID, M.; UELAND, T.; HOV, J. R.; et al. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *Journal of Internal Medicine*, v. 277, p. 717–726, 2015.
- TURNER, N.; HEILBRONN, L. K. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 19, p. 324–330, 2008.
- TURPIN, S. M.; NICHOLLS, H. T.; WILLMES, D. M.; et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metabolism*, v. 20, p. 678–686, 2014.
- UFNAL, M.; ZADLO, A.; OSTASZEWSKI, R. TMAO: a small molecule of great expectations. *Nutrition*, v. 31, p. 1317–1323, 2015.
- VANNUCCHI, H.; MARCHINI, J. S.; SANTOS, J. E.; DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E. Avaliação antropométrica e bioquímica do estado nutricional. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 17, p. 7–28, 1984.
- VELASQUEZ, M. T.; RAMEZANI, A.; MANAL, A.; RAJ, D. S. Trimethylamine N-oxide: the good, the bad and the unknown. *Toxins*, v. 8, p. 485–495, 2016.
- VELUTHAKAL, R.; PALANIVEL, R.; ZHAO, Y.; et al. Ceramide induces mitochondrial abnormalities in insulin-secreting INS-1 cells: potential mechanisms underlying ceramide-mediated metabolic dysfunction of the beta cell. *Apoptosis*, v. 10, p. 841–850, 2005.
- VIGELSO, A.; ANDERSEN, N. B.; DELA, F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *International Journal Physiology Pathophysiology and Pharmacology*, v. 6, p. 84–101, 2014.

Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.

VILLELLA, M.; VILLELLA, A. Exercise and Cardiovascular disease. *Kidney e Blood Pressure Research*, v. 39, p. 147-153, 2014.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome: an allostatic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1801, p. 338-349, 2010.

VOSSELMAN, M. J.; HOEKS, J.; BRANS, B.; et al. Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. *International Journal of Obesity*, v. 39, p. 1696-1702, 2015.

WANG, C. H.; WANG, C. C.; WEI, Y. H. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitchondrial role type 2 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1201, p. 157-165, 2010.

WANG, F.; HAN, J.; HE, Q.; et al. Applying 1H NMR spectroscopy to detect changes in the urinary metabolite levels of chinese half-pipe snowboarders after different exercises. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 3, p. 1-9, 2015.

WANG, X.; RAO, R. P.; KOSAKOWSKA-CHOLODY, T.; et al. Mitochondrial degeneration and hot apoptodis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutante mice. *The Journal of Cell Biology*, v. 184, p. 143-158, 2009.

WANG, Z.; KLIPFELL, E.; BENNETT, B. J.; et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, v. 472, p. 57-63, 2011.

WARBURTON, D. E.; BREDIN, S. S.; HORITA, L. T. et al. The health benefits of interactive video game exercise. *Appllied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v. 32, p. 655-663, 2007.

WEIJS, P. J.; VANSANT, G. A. Validity of predictive equations for resting energy expenditure in Belgian normal weight to morbid obese women. *Clinical Nutrition*, v. 29, p. 347-351, 2010.

WEIR, J. B. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *Journal of Physiology*, v. 109, p. 1-9, 1949.

WEIR, J. M.; WONG, G.; BARLOW, C.K.; et al, Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *Journal Lipid Research*, v. 54, p. 2898-2908, 2013.

WHO | Obesity and overweight. WHO, 2017-10-12 09:56:19 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

WITVROUW, E.; MAHIEU, N.; ROOSEN, P.; MCNAIR, P. The role of stretching in tendon injuries. *British Journal Sports Medicine*, v. 41, p. 224-226, 2007.

WOOLCOTT, O. O.; BERGMAN, R. N. Relative fat mass (RFM) as a new estimator of whole-body fat percentage - A cross-sectional study in American adult individuals. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-11, 2018.

YANCEY, P. H. Water stress, osmolytes and proteins. *American Zoologist*, v. 41, p. 699-709, 2001.

YIN, X.; LANZA, I. R.; SARR, M. G.; et al. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism*, v. 99, p. E209-E216, 2014.

ZDZIARSKI, L. A.; WASSER, J. G.; VINCENT, H. K. Chronic pain management in the obese patient: a focused review of key challenges and potential exercise solutions. *Journal of Pain Research*, v. 8, p. 63-77, 2015.

ZEVIANI, M.; DI DONATO, S. Mitochondrial disorders. *Brain*, v. 127, p. 2153-2172, 2004.

ZHANG, Y.; ZENG, X.; JIN, S. Autophagy in adipose tissue biology. *Pharmacological Research*, v. 66, p. 505-512, 2012.

ZHANG, A. Q.; MITCHELL, S. C.; SMITH, R. L. Dietary precursors of trimethylamine in man: a pilot study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 515-520, 1999.

ZHANG, H.; TONG, T. K.; QIU, W.; et al. Comparable effects of high-intensity interval training and prolonged continuous exercise training on abdominal visceral fat reduction in obese young women. *Journal of Diabetes Research*, v. 2017, p. 1-9, 2017.

ANEXOS

Anexo A - Aprovação dos CEPs

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ofício nº 139/2016
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 13 de janeiro de 2016

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA EM MULHERES COM OBESIDADE SUBMETIDAS A EXERCÍCIO FÍSICO"** – versão 4, de 26/11/2015, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como os **Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 4, de 26/11/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 3257/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

CAMILA FERNANDA COSTA E CUNHA MORAES BRANDÃO
PROF.DR.JULIO SÉRGIO MARCHINI(ORIENTADOR)
Depto. de Clínica Médica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 31 de março de 2016.

Projeto de pesquisa: "METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA EM MULHERES COM OBESIDADE SUBMETIDAS A EXERCÍCIO FÍSICO".

Pesquisador Responsável: Camila Fernanda Costa e Cunha Moraes Brandão

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

"O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 446/12. Diante disso, a FCFRP-USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Cleni Mara Marzocchi Machado
 Cleni Mara Marzocchi Machado
 Coordenadora do CEP/FCFRP

Maria Vitória Lopes Badra Bentley
 Maria Vitória Lopes Badra Bentley
 Diretora da FCFRP/USP

Universidade de São Paulo
Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho intitulado: "METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL E RESPOSTA ANTIINFLAMATÓRIA EM MULHERES COM OBESIDADE SUBMETIDAS A EXERCÍCIO" (CAAE: 42445614.7.3002.5659), de autoria da pesquisadora Camila Fernanda Costa e Cunha Moraes Brandão, que teve como co-participante a Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto/USP, foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão em 30 de março de 2016.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2018.

Rafael P. Menezes
Rafael Pombo Menezes
Vice-Coordenador do CEPIEEFERP

Anexo B - Cálculos da composição corporal através do métodos de diluição de óxido de deutério

A partir do enriquecimento em óxido de deutério da água corporal os seguintes parâmetros podem ser calculados (IAEA, 2013):

- Água corporal total (ACT);
- Massa livre de gordura (MLG);
- Massa gorda (MG).

Para calcular A ACT, é necessário as seguintes informações:

- a) W = peso total da água adicionada ao preparar a diluição da dose (g);
- b) A = peso da dose ingerida pelo participante (g);
- c) a = peso da dose presente na dose diluída (g);
- d) ΔDD = enriquecimento em 2H da dose diluída (ppm de excesso 2H): a abundância de 2H na dose diluída (ppm 2H) menos abundância de 2H na água potável usada para fazer a diluição (ppm 2H);
- e) ΔAC = enriquecimento em 2H da água corporal (ppm de excesso de 2H): a abundância de 2H na amostra de urina pós-dose (ppm 2H) menos a abundância de 2H na amostra basal (ppm 2H);
- f) perda acumulada de 2H na urina (este fator é multiplicado por dois como fórmula para estimar as perdas totais de água no corpo, sensível, bem como insensível), expresso em moles (g/18,0153) ou kg de acordo com as unidades em que é expresso o N_D .

Além disso, o peso corporal do participante é necessário para estimar composição corporal a partir do valor da ACT calculada. A ACT é calculada a partir do espaço de diluição 2H (N_D).

$$N_D(moles) = \frac{W}{A} \times \frac{\Delta DD}{\Delta AC} - (2 \times \text{perda de } ^2H \text{ na urina})$$

$$N_D(kg) = \frac{W}{A} \times \frac{\Delta DD}{\Delta AC} \times \frac{1}{1000} - (2 \times \text{perda de } ^2H \text{ na urina})$$

$$ACT(kg) = \frac{WA}{a} \times \frac{\Delta DD}{DAC} \times \frac{1}{1000 \times 1,041} - (2 \times \text{perda de } ^2H \text{ na urina})$$

A ACT é usada para estimar a MLG, assumindo um coeficiente de hidratação da MLG de 73,2% em adultos:

$$MLG (kg) = \frac{ACT}{0,732}$$

A MG é calculada subtraindo o MLG do peso corporal:

$$MG (kg) = massa\ corporal - MLG$$

Onde:

W: peso total da água adicionada ao preparar a diluição da dose (g);

A: peso da dose ingerida pelo participante (g);

18,0153: peso molecular da água;

a: peso da dose presente na dose diluída (g);

ΔDD : enriquecimento em 2H da dose diluída (ppm de excesso 2H);

ΔAC : enriquecimento em 2H de água corporal (ppm de excesso 2H).

ACT = água corporal total expressa em kg;

MLG = massa livre de gordura expressa em kg;

Massa corporal = expressa em kg.

Os resultados são frequentemente expressos como uma porcentagem do peso corporal:

$$MG(\%) = \frac{MG (kg)}{Massa\ corporal (kg)} \times 100$$

Anexo C - Cálculos do volume de oxigênio (Vo₂) e dióxido de carbono (Vco₂) por calorimetria indireta

Inicialmente, o calorímetro Quark RMR[®] (Cosmed, Rome, Italy) ficou ligado por 45 minutos antes de iniciar os três passos da calibração: 1) ar ambiente; 2) pressão barométrica com uma mistura padrão de gases (CO₂, O₂ e N₂, nas concentrações de 5%, 16% e 79%, respectivamente); e, 3) Validação da medida do fluxo da turbina utilizando uma seringa de calibração de 3 L.

Este calorímetro de circuito aberto e a medição são feitas de respiração a respiração em um *canopy* (capacete próprio do equipamento). Também, permite que o fluxo do ar captado através do *canopy* seja monitorado pela fração de CO₂ no ar expirado (FECO₂) medido a cada intervalo programado (normalmente a cada 5 segundos). Dessa maneira, o FECO₂ deve ser mantido entre 0,7% a 1,3%, segundo o fabricante, podendo ser monitorado com um interruptor do equipamento, permitindo aumentar ou diminuir a entrada do fluxo de ar. O calorímetro também pode ser ajustado para coletar dados a cada 5 segundos, considerando uma frequência respiratória de 12 respirações por minuto.

O calorímetro quantifica os volumes de oxigênio consumido e volume de dióxido de carbono produzido (Vo₂ e Vco₂, respectivamente), através da medida do volume de ar inspirado e expirado pelo indivíduo (VI e VE, respectivamente), das frações inspirado e expirado do oxigênio (FIO₂ e FEO₂, respectivamente), das frações inspirado e expirado do dióxido de carbono (FICO₂ e FECO₂, respectivamente).

O volume inspirado pode ser calculado pela transformação de Haldane, calculando um fluxo desconhecido a partir de um fluxo conhecido (Branson e Johannigman, 2004). Segue abaixo as fórmulas para encontrar o resultado do VO₂ e VCO₂:

$$Vo_2 = (VI \times FIO_2) - (VE \times FEO_2)$$

Onde:

VI: volume inspirado (L/min);

VE: volume expirado (L/min);

FIO₂: fração inspirada de oxigênio (L/min);

FEO₂: fração expirada de oxigênio (L/min).

A calorimetria indireta parte do princípio de que os únicos gases que sofrem trocas pulmonares são o O₂ e CO₂, portanto a quantidade de nitrogênio inspirada é igual à quantidade expirada.

$$VI \times FIN_2 = VE \times FEN_2$$

Ou

$$VI = \frac{VE \times FEN_2}{FIN_2}$$

Onde:

VI: volume inspirado (L/min);

VE: volume expirado (L/min);

FIN₂: fração do nitrogênio inspirado (L/min);

FEN₂: fração do nitrogênio expirado (L/min).

As frações FIN₂ e FEN₂ também devem ser calculadas, a partir das frações inspiradas e expiradas e expiradas de O₂ e CO₂:

$$FIN_2 = 1 - FIO_2 - FICO_2$$

Onde:

FIN₂: fração de nitrogênio inspirado (L/min);

FIO₂: fração inspirada de oxigênio (L/min);

FICO₂: fração inspirada de dióxido de carbono (L/min).

$$FEN_2 = 1 - FEO_2 - FECO_2$$

Onde:

FEN₂: fração de nitrogênio expirado (L/min);

FEO₂: fração expirada de oxigênio (L/min);

FECO₂: fração expirada de dióxido de carbono (L/min).

Portanto, o VI pode ser calculado:

$$VI = VE \times \frac{1 - FEO_2 - FECO_2}{1 - FIO_2 - FICO_2}$$

Resumindo as fórmulas acima para o cálculo do V_{O₂}, com a seguinte:

$$V_{O_2} = \left(\frac{1 - FEO_2 - FECO_2}{1 - FIO_2 - FICO_2} \right) \times FIO_2 - VE \times FEO_2$$

Para o cálculo de V_{CO₂}, também utiliza a transformação de Haldane, sendo:

$$V_{CO_2} = VE \times FECO_2 - VI \times FICO_2$$

Onde:

V_{CO₂}: volume de dióxido de carbono produzido (L/min).

VE: volume expirado (L/min).

FECO₂: fração expirada de dióxido de carbono (L/min).

FICO₂: fração inspirada de dióxido de carbono (L/min).

Quando obtido os valores de Vo_2 e Vco_2 , pode-se calcular os valores de coeficiente respiratório, gasto energético em repouso e oxidação de substratos (carboidratos e lipídios):

$$QR = \frac{Vco_2}{Vo_2}$$

Onde:

QR: coeficiente respiratório;

Vco_2 : volume de oxigênio produzido;

Vco_2 : volume de dióxido de carbono produzido.

$$TMR (kcal/dia) = (3,941Vo_2 + 1,106Vco_2) \times 1440$$

Onde:

TMR: taxa metabólica de repouso;

Vo_2 : volume de oxigênio consumido em L/min;

Vco_2 : volume de dióxido de carbono produzido em L/min;

1440: número de minutos por dia.

$$Oxidação\ Carboidrato\ (g/dia) = (4,585 \times Vco_2 - 3,226 \times Vo_2) \times 1440$$

$$Oxidação\ Lipídios\ (g/dia) = (1,695 \times Vo_2 - 1,701 \times Vco_2) \times 1440$$

Onde:

Vo_2 : volume de oxigênio consumido em L/min;

Vco_2 : volume de dióxido de carbono produzido em L/min;

1440: número de minutos por dia.

Anexo D - Parâmetros de Monitoração da reação múltipla do TMAO e precursores utilizados na análise de LC-MS / MS.

Compostos	Transição de MRM (m/z)	Fonte de tensão (V)	Energia de Colisão (eV)
TMAO	75,9 → 58,9	20	11
² H ₉ -TMAO	85,0 → 68,0	20	11
TMA	60,0 → 45,0	25	10
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N]-TMA	64,0 → 48,0	25	10
Betaina	118,1 → 58,1	40	22
¹³ C ₂ -betaina	120,1 → 58,1	40	22
Colina	104,1 → 60,1	40	15
² H ₉ -colina	113,2 → 69,1	40	15
Carnitina	162,1 → 103,0	25	14
² H ₉ -carnitina	171,1 → 69,1	25	14

MRM: monitoramento de reações múltiplas.

Anexo E – Parâmetros analíticos selecionados para a quantificação de esfingolípídios.

Compostos	Tensão/Colisão (V)	Transição de MRM (m/z)
S1P d18:1	28/14	380,2 → 264,3
S1P d17:1, IS	28/14	366,2 → 250,3
Cer (d18:1/16:0)	28/26	538,5 → 264,3
Cer (d18:1/18:1)	28/24	564,5 → 264,3
Cer (d18:1/18:0)	30/26	566,5 → 264,3
Cer (d18:1/20:1)	28/26	592,3 → 264,3
Cer (d18:1/20:0)	28/26	594,3 → 264,3
Cer (d18:1/22:1)	30/30	620,6 → 264,3
Cer (d18:1/22:0)	30/30	622,6 → 264,3
Cer (d18:1/24:1)	28/30	648,6 → 264,3
Cer (d18:1/24:0)	34/26	650,6 → 264,3
Cer (d18:1/17:0), IS	28/28	552,5 → 264,3
SM (d18:1/16:0)	58/26	703,6 → 184,1
SM (d18:1/18:1)	32/40	729,6 → 184,1
SM (d18:1/18:0)	58/32	731,5 → 184,1
SM (d18:1/20:1)	38/30	757,4 → 184,1
SM (d18:1/20:0)	46/26	759,7 → 184,1
SM (d18:1/22:1)	38/30	785,7 → 184,1
SM (d18:1/22:0)	40/30	787,7 → 184,1
SM (d18:1/24:1)	38/30	813,7 → 184,1
SM (d18:1/24:0)	36/30	815,7 → 184,1
SM (d18:1/17:0), IS	56/30	717,6 → 184,1

MRM: monitoramento de reações múltiplas. S1P: esfingosina-1-fosfato. Cer: ceramida. SM: esfingomielina. IS: padrão interno.

Anexo F - Escala de percepção subjetiva de esforço (PSE)

Esta escala foi inicialmente proposta por Borg (1978), com valores de 6 à 20, mimitizando a frequência cardíaca de repouso à máxima, quando colocado um 0 na frente de cada número. A PSE e a frequência cardíaca são linearmente correlacionadas entre si e com a intensidade de trabalho (PANDOLF, 1982). Além, de possuir relação com concentrações de lactato e VO_2 (MORGAN; POLLOCK, 1977). Para facilitar o entendimento, a PSE foi modificada para notas de 0 à 10 (Foster, 1998).

Escala de percepção subjetivo de esforço (PSE).

Classificação	Sensação de Esforço
0	Nenhum
1	Muito fraco
2	Fraco
3	Moderado
4	Um pouco forte
5	Forte
6	-
7	Muito forte
8	-
9	-
10	Muito, muito forte

Referência: Foster (1998).

Anexo G - Ficha de avaliação do teste aeróbio (*Shuttlen walking test* adaptado)

Data				
Nome				
FC Repouso				
Km/h	Tempo (seg)	Nº de voltas do estágio	FC	PSE
4	9	20		
5	7,2	25		
6	6	30		
7	5,1	35		
8	4,5	40		
9	4	45		
10	3,6	50		
11	3,3	55		
12	3	60		
13	2,8	65		
14	2,6	70		
15	2,4	75		
FC Final				
Tempo Final				

FC: frequência cardíaca. PSE: percepção subjetiva de esforço. Seg: segundos.

Anexo H - Classificação da aptidão cardiorrespiratória pelo consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{max}}$ - ml/kg.min) para o sexo feminino.

Faixa Etária (anos)	Muito fraca	Fraca	Regular	Boa	Excelente
15 - 24	< 19,45	19,45 – 31,12	31,13 – 36,95	36,96 – 40,84	> 40,85
25 – 34	< 19,05	19,05 – 30,48	30,49 – 36,19	36,20 – 40,00	>40,01
35 – 44	< 17,45	17,45 – 27,92	27,93 – 33,15	33,16 – 34,08	> 34,09
45 – 54	< 15,55	15,55 – 24,88	24,89 – 29,54	29,55 – 32,65	> 32,66
55 – 64	< 14,30	14,30 – 22,88	22,89 – 27,17	27,18 – 30,03	> 30,04
65 - 74	< 12,55	12,55 – 20,08	20,09 – 23,84	23,85 – 26,35	> 26,36

Classificação da avaliação funcional de indivíduos ativo e saudáveis da população brasileira de acordo com a faixa etária (HERDY; CAIXETA, 2016).

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos CEPs.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(de acordo com a Resolução 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde)

TÍTULO DO PROJETO: Metabolismo Energético Mitocondrial e Resposta anti-Inflamatória em Mulheres com Obesidade Submetidas a Exercício Físico

Responsável: Camila Fernanda Brandão

Supervisor: Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini

Contato dos Pesquisadores Responsáveis: Av. Bandeirantes 3900, CEP 14049-900 Ribeirão Preto/SP, Tel: (16) 3315-3375

E-mail: jsmarchi@fmrp.usp.br ou camilaferbrandao@hotmail.com

Você está sendo convidada a participar de um trabalho de pesquisa que será desenvolvido pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

1. Justificativa e Objetivo da Pesquisa

A obesidade tem grande impacto social e econômico, atinge a qualidade de vida com a incapacidade na realização das atividades de vida diárias. Ações para o controle desta situação são necessárias. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar as alterações da saúde quanto à inflamação e gasto de calorias em obesas após a realização de exercício físico.

2. Participação

Não será necessário que fique internado para realizar os exames.

Durante todo o tempo dos exames e do estudo você será acompanhado por profissionais (médicos da Unidade Metabólica, nutricionista e professor de educação física). Você receberá suporte básico de vida conforme necessário durante os dias da execução do projeto.

Você deverá realizar alguns exames e responder algumas perguntas.

As perguntas serão sobre a sua saúde, atividade física e alimentação.

Quanto aos exames, serão feitos os seguintes:

Será verificado seu peso, com auxílio da balança, a altura com o estadiômetro, estes testes não causam desconforto nem dor.

A quantidade de gordura e outros tecidos de seu corpo será medida por bioimpedância (nesse exame, pequenos adesivos serão colocados nas extremidades do corpo, pés e mãos, e serão ligados a um aparelho). Durante este teste, que dura 5 minutos. Também será medido com um adipômetro (uma régua que parece uma pinça, sem pontas), uma régua que mede o tamanho do seus ossos (paquímetro) e uma fita métrica que medirá as circunferências de seu corpo, você não sentirá nada. A coleta será feita pela responsável do projeto.

Também serão anotadas informações sobre a sua alimentação um dia antes da realização do exercício físico e em mais dois dias depois da realização do exercício físico. Isso será feito pela aplicação de um questionário sobre alimentação, que demora cerca de 20 minutos para você responder. A coleta será feita pela responsável do projeto.

Para o cálculo do gasto de energia basal, será realizado um exame pela manhã, após jejum de 12 horas. Você ficará deitado em uma maca, e será colocado em cima de sua cabeça um capacete, você continuará respirando normalmente, permanecendo 30 minutos em repouso. A coleta será feita pela responsável do projeto.

Para analisar a absorção de alguns nutrientes de sua alimentação, será colhida urina e saliva por 24 horas, sendo desprezada a primeira urina do dia, e colhida a partir daí em potes de armazenamento. A saliva será colhida através da mastigação de um pedaço de gases e armazenada em um tubo. A coleta será feita pela responsável do projeto.

Para análise da gordura, será colhido com uma agulha própria para isto um pedaço equivalente à metade de uma colher de café (0,5 g) de gordura abdominal. Antes você receberá uma anestesia local para diminuir a dor relacionada ao exame, e, será realizado pela médica Thays de Vasconcelos Gomes Firmino, experiente com tais habilidades para garantir a segurança da voluntária.

Será colhido um tubo de sangue, através de punção venosa, para analisar os parâmetros sanguíneos relacionados à saúde, realizado pela enfermeira Maria do Rosário Del Lama de Unamuno do HCFMRP/USP.

A coleta da gordura abdominal e do sangue serão realizadas em sala cirúrgica do HCFMRP/USP.

Você realizará em apenas um dia, onde quem determinará quando deve parar será você mesmo. Neste momento, será colhido uma gota de sangue da sua orelha, através de uma picada de agulha própria para isso, para análise de uma substância que normalmente aumenta durante a prática de exercício físico (determinação de lactato). E, durante o exercício físico ainda, você o realizará com uma máscara que analisará a quantidade de energia gasta no momento do esforço. Você conseguirá respirar normalmente. Será realizada na Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EEFERP/USP).

Você participará de um grupo de exercício físico durante 8 semanas com frequência de 3 vezes na semana, com duração de 60 minutos em cada dia de exercício físico. Serão compostos de exercícios que trabalham todos os membros do corpo, braços e pernas, com pesos apropriados e caminhada. Você aprenderá a controlar a intensidade do seu esforço durante os exercícios, e todos serão realizados numa intensidade moderada, no qual você não se sentirá totalmente cansada.

Você poderá receber auxílio financeiro para despesas relacionadas ao projeto, como auxílio para alimentação nos dias que virá realizar os exames em jejum e auxílio para transporte nos dias da execução do projeto.

3. Risco

De acordo com a resolução CNS 466/2012, toda pesquisa com seres humanos envolve riscos, e embora possam ser mínimos. Os exames que serão realizados podem causar algum desconforto, como: constrangimento para responder os questionários; desconfortos ou dores com as agulhas para a coleta de sangue e a biópsia, mas receberão anestésicos para minimizar as dores; poderão sentir dores musculares tardias ou cansaço físico após as sessões de exercício físico; demanda de tempo das voluntárias para coleta de urina e saliva 24 hs, assim como todas outras avaliações. Estas avaliações podem causar desconfortos físicos, mas não serão prejudiciais à saúde mental ou moral.

4. Benefícios

Este estudo trará benefícios para obter conhecimento da obesidade. Todos os participantes receberão os resultados quanto ao desempenho físico, a composição corporal e o estado geral de saúde. As informações obtidas neste estudo poderão ser úteis cientificamente.

5. Privacidade

Os dados individualizados serão confidenciais e assim que obtidos serão enviados para os participantes e os resultados coletivos serão divulgados nos meios científicos.

6. Contato com os pesquisadores

Os números de telefone do responsável estão à disposição para esclarecimento de dúvidas ou reclamações referente ao estudo.

Pesquisadora principal: Camila Fernanda C. C. M. Brandão.

Telefones: (16) 3315-3375 / 98140-2040 / (65) 9256-9263

7. Desistência

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode ter liberdade de recusar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios, aos quais você tem direito. Se sentir incomodado com alguma pergunta dos questionários, você não precisará respondê-la.

Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Se tiverem dificuldades para ler ou escrever haverá um pesquisador para preencher todos os questionários.

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo a que fui convidado(a) a participar, assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ R.G.: _____

Endereço: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do voluntário

Confirmo que expliquei detalhadamente para o paciente e/ou seu(s) familiar(es), ou responsável(eis), o propósito, os riscos, os benefícios e as alternativas para o tratamento(s)/procedimento(s) acima descritos.

Camila Fernanda Brandão
Pesquisadora responsável

Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini
Supervisor

Apêndice B – Ficha de anamnese aplicada no processo de recrutamento das participantes.

ANAMNESE DA ENTREVISTA

Data	
Nome	
Idade	
Peso:	
Altura:	
IMC (kg/m²):	
Profissão	
Escolaridade	
Estado civil	
Endereço	
Cidade	
Telefone celular	
Telefone residencial	

01	Está em tratamento médico no momento?	Sim	Não
	Qual?		
02	Faz uso de alguma medicação?	Sim	Não
	Qual?		
04	Possui alguma doença? (ex: diabetes, hipertensão, osteoporose, dislipidemia, cardiopatias, artrose, etc.)	Sim	Não
	Qual?		
06	Possui alguma alergia?	Sim	Não
	Qual?		
08	Pratica alguma atividade física ou exercício físico programado?	Sim	Não
	Qual? Quantas vezes na semana? Quantas horas por dia?		
	Se não, há quanto tempo não pratica exercício físico?		
11	É fumante?	Sim	Não

12	Faz reposição hormonal e/ou de vitaminas e minerais?	Sim	Não
13	Faz uso de algum suplemento e/ou medicamento para perda de peso? (ex: <i>shakes</i>)	Sim	Não
14	Realizou algum procedimento cirúrgico, como cirurgia bariátrica?	Sim	Não
15	Realiza algum acompanhamento nutricional e/ou faz uso de dietas para perda de peso?	Sim	Não
	Há quanto tempo faz acompanhamento?		

Em caso de emergência, entrar em contato:

1. Nome/parentesco		Telefone:
2. Nome/parentesco		Telefone:
Possui convênio médico?	() Sim () Não	

Por que você está interessada em participar da pesquisa?

Outras informações que julgar importante: _____

Apêndice C – Parâmetros analisados no tecido adiposo para avaliar a respiração mitocondrial através do equipamento Oroboros®

Figura 14. Parâmetros da respiração mitocondrial em tecido adiposo branco.

Amostras de tecidos subcutâneo adiposo (~50 mg de tecido) foram incubados em solução BIOPS contendo 1 mg/mL de saponina durante 10 minutos sob agitação de 100 rpm. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao monitoramento do consumo de oxigênio como descrito em Materiais e Métodos. As setas indicam a adição de um mix de substratos (1,5 mM piruvato; 0,28 mM malato; 1,3 mM glutamato), ADP (240 μM), oligomicina (0,5 $\mu\text{g/mL}$), CCCP (0,50 μM cada adição até 2 μM) e antimicina A (AA) (0,6 $\mu\text{g/mL}$) para determinar os estados de fosforilação (V_{ADP}), não-fosforilante (V_{OLIGO}), não-acoplado (V_{CCCP}) e não-mitocondrial (V_{AA}).

Apêndice D – Dados sem tratamento estatístico

Nesta seção estão apresentados tabelas com os dados brutos de todas as avaliações das 14 mulheres que finalizaram o estudo.

Tabela 5. Dados brutos de medidas antropométricas pré e pós-intervenção.

N	MC		CC		CA		CQ		IAC	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	84	82	93	88	97	100	112	112	41,0	39,2
2	74	71	88	86	105	98	112	113	40,8	40,2
3	78	79	91	86	101	98	115	114	40,4	38,6
4	93	92	84	84	103	103	121	121	34,3	34,6
5	80	81	89	90	103	104	108	108	39,4	39,8
6	92	96	88	89	102	107	123	125	36,0	36,4
7	89	92	95	95	107	109	121	123	41,1	41,3
8	96	98	117	104	124	122	127	121	48,1	44,7
9	89	88	90	88	108	107	128	127	40,2	39,4
10	103	102	102	101	113	110	123	123	43,8	43,4
11	71	72	96	94	105	105	103	103	45,8	45,1
12	82	85	84	82	100	103	124	123	37,4	36,5
13	81	84	99	97	115	109	118	118	45,5	45,1

N: número de participantes. MC: massa corporal (kg). CC: circunferência da cintura (cm). CA: circunferência do abdômen (cm). CQ: circunferência do quadril (cm). IAC: índice de adiposidade corporal.

Tabela 6. Dados brutos da composição corporal pré e pós-intervenção.

N	ACT		ACT (%)		GC		GC (%)		MLG		MLG (%)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	34979	35748	42	44	36	33	43	40	48	49	57	60
2	27775	34106	37	48	36	25	49	35	38	47	51	65
3	31237	31487	40	40	36	36	45	46	43	43	55	54
4	36680	36182	40	39	42	43	46	46	50	49	54	54
5	30690	33041	38	41	38	36	48	44	42	45	52	56
6	34218	35868	37	37	46	47	49	49	47	49	51	51
7	35727	28830	40	31	40	53	45	57	49	39	55	43
8	34976	36833	36	38	48	47	50	48	48	50	50	52
9	32842	32950	37	37	44	43	49	49	45	45	51	51
10	41770	41582	41	41	46	45	44	44	57	57	56	56
11	27039	30043	38	42	34	31	48	43	37	41	52	57
12	31742	34740	39	41	39	38	47	44	43	47	53	56
13	29494	32344	36	39	41	40	50	47	40	44	50	53
14	42643	43235	46	46	35	36	37	38	58	59	63	62

N: número de participantes. ACT: água corporal total (kg). GC: gordura corporal (kg). MLG: massa livre de gordura (kg).

Tabela 7. Dados brutos da calorimetria indireta pré e pós-intervenção.

N	V _{O2}		V _{CO2}		TMR		QR		Ox. LIP		Ox. CHO		Ox. Total	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	0,227	0,260	0,166	0,197	1550	1789	0,73	0,76	145	152	41	89	186	240
2	0,148	0,244	0,116	0,172	1026	1661	0,79	0,70	76	174	78	-2	154	172
3	0,123	0,229	0,091	0,160	844	1556	0,74	0,70	78	167	25	-12	103	155
4	0,225	0,247	0,172	0,167	1550	1667	0,76	0,68	128	191	85	-45	213	147
5	0,117	0,246	0,089	0,175	803	1674	0,76	0,71	67	169	42	13	109	182
6	0,253	0,264	0,177	0,188	1719	1800	0,70	0,71	183	183	-9	11	174	194
7	0,270	0,269	0,207	0,196	1862	1838	0,77	0,73	151	175	109	41	260	216
8	0,129	0,261	0,098	0,179	886	1765	0,76	0,69	73	196	48	-32	121	165
9	0,293	0,331	0,244	0,220	2050	2229	0,83	0,66	118	267	244	-89	362	178
10	0,276	0,275	0,200	0,199	1884	1878	0,73	0,72	181	183	39	33	220	215
11	0,188	0,235	0,144	0,157	1298	1584	0,76	0,67	107	187	73	-57	180	130
12	0,221	0,257	0,157	0,189	1505	1762	0,71	0,74	154	164	8	51	162	214
13	0,131	0,253	0,096	0,176	895	1718	0,73	0,70	85	185	22	-15	106	170
14	0,286	0,322	0,200	0,215	1944	2169	0,70	0,67	209	259	-15	-83	193	176

N: número de participantes. V_{O2}: volume de oxigênio (L/min). V_{CO2}: volume de dióxido de carbono (L/min). TMR: taxa metabólica de repouso (kcal/dia). QR: coeficiente respiratório (V_{O2}/V_{CO2}). Ox. LIP: oxidação lipídica (g/dia). Ox. CHO: oxidação de carboidrato (g/dia). Ox. Total: oxidação total (g/dia).

Tabela 8. Dados brutos do teste de força muscular pré e pós-intervenção.

N	MS1		MS2		MI	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	47	58	48	53	98	79
2	22	35	47	42	24	51
3	20	40	47	53	41	63
4	31	33	48	53	49	80
5	31	29	53	79	17	69
6	25	15	37	62	21	75
7	-	-	-	-	-	-
8	34	28	46	70	21	74
9	26	39	50	58	41	53
10	33	50	41	52	41	67
11	34	33	32	70	19	63
12	25	30	37	56	29	45
13	27	31	47	58	41	58
14	28	38	59	79	24	111

N: número dos participantes. Teste de repetições máxima. MS1: membros superiores peitoral (supino, kg). MS2: membros superiores costa (remada, kg). MI: membros inferiores (agachamento, kg).

Tabela 9. Dados brutos de TMAO e precursores pré e pós-intervenção.

N	TMAO		Colina		Betaina		Carnitina	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	4,3	3,8	1,6	1,7	39,5	20,5	42,2	34,3
2	3,5	3,1	1,4	1,6	31,3	38,9	40,2	35,6
3	13,1	12,5	1,6	1,9	45,9	56,3	53,9	49,8
4	4,7	3,1	1,6	1,7	30,3	29,8	58,3	58,4
5	6,4	7,2	1,3	2,1	22,2	20,0	28,4	32,0
6	22,9	7,9	1,7	2,0	19,2	19,2	42,0	39,6
7	11,0	4,6	1,5	1,8	36,1	38,4	39,1	39,1
8	20,0	8,8	2,3	2,1	27,9	27,4	44,0	40,3
9	5,4	5,4	1,9	2,5	16,0	17,0	39,1	43,6
10	4,0	2,0	1,5	2,2	29,9	41,4	31,2	43,3
11	9,1	4,0	1,8	2,2	39,4	32,8	43,6	37,7
12	4,7	3,5	1,7	2,5	40,7	34,9	34,6	39,3
13	3,0	6,1	1,4	2,2	45,6	40,9	47,3	43,6
14	3,0	3,9	1,7	2,2	27,1	28,6	35,4	38,0

N: número de participantes. TMAO: trimetilamina N-óxido. Unidades de medida: µmol/L.

Tabela 10. Dados brutos do teste físico aeróbio pré e pós-intervenção.

N	Estágio		Veloc		Tempo		FC rep		FC final		V _{O2max}		Vmax		Lac _{pico}		VLan1		FCLan1		PSE Lan1		VLan2		FCLan2		PSE Lan2	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	5	6	8	9	14	18	90	84	205	204	37	41	7	8	11	9	5	6	161	158	3	4	6	7	179	176	4	6
2	5	6	8	9	14	17	109	86	182	190	37	41	7	8	9	9	5	6	134	139	2	5	6	7	150	158	2	7
3	4	5	7	8	12	15	84	90	176	192	33	37	6	8	6	10	5	6	105	129	2	5	5	7	111	150	2	7
4	6	6	9	9	16	16	65	83	178	183	41	41	8	9	7	5	6	7	155	168	4	6	7	8	171	179	7	8
5	5	5	8	8	16	16	82	87	193	189	37	37	7	7	11	7	5	5	122	142	5	4	6	6	147	165	7	7
6	4	4	7	7	12	12	82	92	186	157	33	33	7	7	8	7	6	6	147	150	5	6	6	6	164	158	7	8
7	4	6	7	9	12	16	71	86	177	181	33	41	7	6	8	12	6	5	119	130	4	6	6	6	143	146	5	7
8	5	5	8	8	14	14	63	81	183	181	37	37	7	8	9	6	6	7	119	150	3	6	6	7	139	168	5	7
9	5	6	8	9	15	16	84	78	193	186	37	41	6	7	14	9	5	6	159	165	2	3	5	7	174	180	4	5
10	4	5	7	8	12	16	89	80	188	180	33	37	7	7	8	7	6	6	152	148	3	3	6	7	167	165	4	4
11	4	5	7	8	12	14	91	94	186	185	33	37	7	8	10	6	5	5	101	113	2	6	6	7	128	176	4	8
12	5	6	8	9	14	16	92	92	208	201	37	41	7	7	10	10	5	6	158	156	5	6	6	7	186	175	6	7
13	4	4	7	7	10	11	94	91	177	168	33	33	7	8	4	3	5	7	155	164	5	7	6	7	175	184	7	9
14	6	6	9	9	16	16	82	97	190	181	41	41	7	7	11	8	6	6	140	151	3	5	7	7	163	163	4	7

N: número de participantes. Estágio: número de estágios concluídos do teste físico. Veloc: velocidade final do estágio (km/h). Tempo: tempo total do teste físico (minutos). FC rep: frequência cardíaca de repouso (bpm/min). FC final: frequência cardíaca final (bpm/min). V_{O2max}: volume de oxigênio máximo calculado (ml/kg/min). Vmax: velocidade máxima de acordo com limiar anaeróbio (km/h). Lac_{pico}: lactato pico (mmol/L). VLan1: velocidade do limiar anaeróbio 1 (km/h). FCLan1: frequência cardíaca do limiar anaeróbio 1 (bpm/min). PSE1: percepção de esforço do limiar anaeróbio 1. VLan2: velocidade do limiar anaeróbio 2 (km/h). FCLan2: frequência cardíaca do limiar anaeróbio 2 (bpm/min). PSE Lan2: percepção de esforço do limiar anaeróbio 2. Resultados obtidos do teste físico *shuttlen walking test* adaptado.

Tabela 11. Dados brutos da respiração mitocondrial pré e pós-intervenção.

N	V _{ADP}		V _{OLIGO}		V _{CCCP}		V _{ADP/VOLIGO}		V _{OLIGO/VCCCP}		CS		UCPI	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	29	22	25	18	35	41	1,8	1,7	0,4	0,2	1,6	8,8	1,00	0,77
2	16	15	13	12	16	36	2,5	1,5	0,5	0,2	1,7	6,9	1,00	0,54
3	7	12	5	11	8	23	1,7	1,2	0,5	0,2	3,1	9,6	1,00	1,07
4	10	12	9	7	12	12	1,5	3,8	0,5	0,2	2,1	9,1	1,00	0,90
5	12	10	10	8	13	11	2,1	2,1	0,5	0,5	1,7	5,2	-	-
6	26	21	21	13	28	19	1,5	5,6	0,4	0,1	5,5	19,0	1,00	0,24
7	6	18	5	14	11	24	1,6	1,6	0,4	0,4	0,6	16,0	-	-
8	14	10	12	7	15	13	1,7	1,6	0,5	0,4	0,6	15,9	-	-
9	15	11	13	7	15	27	2,6	1,7	0,4	0,2	3,3	9,6	1,00	0,94
10	9	13	8	9	14	35	1,5	2,7	0,5	0,1	1,0	17,9	1,00	0,60
11	39	20	33	15	37	22	1,8	2,4	0,6	0,4	1,0	7,5	-	-
12	31	9	22	7	26	13	1,5	3,2	0,7	0,2	0,2	5,5	1,00	0,83
13	12	19	10	9	12	21	1,2	3,4	0,5	0,3	0,3	4,6	1,00	0,75
14	25	9	19	8	26	18	3,9	1,4	0,4	0,3	1,3	3,8	-	-

N: número de participantes. V_{ADP}: velocidade de ADP (respiração em estado fosforilação, pmol O₂/mgproteína/min). V_{OLIGO}: velocidade de oligomicina (respiração em estado de não-fosforilação, pmol O₂/mgproteína/min). V_{CCCP}: velocidade de cccp (respiração em estado de não acoplamento, pmol O₂/mgproteína/min). V_{ADP/VOLIGO}: taxa de controle de fluxo em acoplamento. V_{OLIGO/VCCCP}: taxa de controle de fluxo em desacoplamento. CS: atividade da enzima citrato sintase (nmol/min/mg). UCPI: expressão gênica de proteína desacopladora 1.

Tabela 12. Dados brutos de esfingolipídeos pré e pós-intervenção.

N	SIP d18:1		CER 16:0		CER 18:0		CER 20:0		CER 22:0		CER 24:0		CER 18:1		CER 20:1		CER 22:1		CER 24:1	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	283,7	329,7	215,5	173,3	197,6	156,4	20,8	20,4	1728,7	1700,8	230,3	210,3	10,8	7,7	7,4	6,5	8,1	5,5	1082,8	1088,8
2	492,5	479,7	201,4	249,7	145,7	151,2	20,1	19,9	1794,8	1560,2	267,9	222,5	8,8	11,8	7,0	4,8	5,7	8,6	981,9	1152,1
3	477,7	231,6	283,6	100,9	94,6	39,9	12,6		1831,6	547,7	309,2	60,4	13,0	3,9	7,9	1,5	5,8	0,6	1163,8	305,7
4	396,3	363,0	213,5	242,2	82,5	98,2	6,6	11,8	1894,5	1645,2	244,2	303,1	6,3	5,8	3,5	4,4	3,4	5,9	982,1	1193,6
5	301,4	491,2	200,1	231,7	193,1	159,1	30,1	14,4	2289,4	1653,8	325,3	216,7	13,6	8,8	10,3	11,3	16,0	10,2	1960,3	1404,4
6	346,0	412,0	197,6	150,4	85,5	57,8	13,4	5,9	1466,3	1238,1	243,1	205,3	8,0	8,2	9,0	4,3	7,8	4,8	1033,5	583,0
7	460,7	481,6	168,8	181,5	102,7	145,5	10,0	19,0	1310,0	2231,1	184,2	340,1	8,0	9,4	7,3	9,8	2,7	8,3	748,3	1731,8
8	340,8	468,7	211,0	145,1	74,4	79,7	6,8	13,0	1827,0	1524,1	287,6	241,4	5,5	8,4	9,8	5,5	7,0	7,1	685,9	790,6
9	368,0	618,4	108,8	109,8	57,1	81,6	6,3	15,2	1455,4	1528,2	211,7	267,9	9,9	11,0	6,0	10,2	2,9	6,9	569,1	1193,7
10	517,9	496,5	197,7	125,9	121,9	102,9	14,1	13,3	2597,4	1237,7	250,4	133,1	10,5	4,3	12,0	7,6	9,3	7,8	1058,6	839,7
11	316,2	544,6	215,2	142,3	264,2	164,8	24,5	15,7	2445,0	1214,3	283,8	210,4	8,0	8,4	7,6	7,5	10,6	9,0	1370,2	778,8
12	381,2	391,7	196,4	117,9	103,6	73,9	13,0	10,6	1717,6	1255,2	284,2	211,8	8,5	8,5	6,5	7,2	6,0	8,6	1202,3	1005,2
13	519,5	402,8	223,5	109,1	206,9	76,7	16,1	6,3	1806,3	1354,8	246,7	171,6	12,3	6,5	9,8	3,8	8,8	5,3	1335,6	674,6
14	288,6	522,6	193,3	161,6	132,8	79,4	13,8	11,1	2565,2	1203,8	352,4	210,3	9,7	6,6	5,5	5,0	6,2	4,5	1211,4	649,1

N: número dos participantes. SIP: esfingosina-1-fosfato. Cer: ceramidas. Unidades de medida: nmol/L.

Tabela 13. Dados brutos de esfingolipídios pré e pós-intervenção.

N	SM 16:0		SM 18:0		SM 20:0		SM 22:0		SM 24:0		SM 18:1		SM 20:1		SM 22:1		SM 24:1	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	51,4	52,2	12,4	9,1	18,1	16,8	18,1	17,8	21,6	18,7	4,6	3,8	1,4	1,2	17,0	18,5	32,8	33,8
2	57,5	60,9	11,4	12,0	19,0	17,5	19,9	18,1	19,7	19,5	3,9	4,5	1,4	1,5	19,4	19,5	34,5	40,2
3	63,5	31,9	10,3	5,1	17,5	7,0	18,2	7,2	21,7	7,0	3,5	1,8	1,4	0,7	20,0	8,0	33,7	15,0
4	55,1	57,0	6,9	8,5	13,8	14,7	17,6	17,2	19,7	20,5	2,5	2,8	0,9	1,2	18,8	19,4	34,7	37,8
5	57,5	58,1	9,8	9,8	25,4	18,2	26,2	16,5	24,7	14,1	3,1	3,6	1,1	1,2	25,4	19,0	52,3	37,4
6	55,6	52,3	6,8	6,1	17,4	15,6	21,4	19,2	24,5	21,0	2,5	2,3	1,1	1,0	20,6	19,9	42,3	32,1
7	52,2	49,9	10,6	9,1	15,4	19,1	15,8	20,3	16,2	21,1	3,7	2,9	1,3	1,0	16,0	20,0	30,0	40,9
8	60,8	47,6	6,5	5,4	17,7	17,5	22,8	22,8	22,6	23,6	3,0	2,1	1,1	0,8	22,1	23,5	31,4	38,1
9	50,9	54,3	6,7	8,2	21,0	23,5	23,8	24,3	22,8	16,8	2,6	3,4	1,1	1,3	24,9	28,3	37,4	52,6
10	40,8	31,4	5,3	5,0	14,8	11,9	16,4	11,2	14,8	8,5	2,2	2,1	0,7	0,7	15,5	14,0	23,3	23,2
11	56,6	47,0	12,9	9,0	20,7	16,8	20,5	16,5	19,2	10,9	4,8	3,6	1,4	1,0	19,4	18,1	34,6	32,5
12	56,0	45,3	11,4	6,7	22,0	17,6	19,1	15,6	20,8	11,8	3,6	2,6	1,5	0,9	21,0	17,4	34,5	32,6
13	57,1	38,8	12,6	3,7	16,5	12,2	17,5	12,7	17,8	8,0	4,1	1,7	1,1	0,5	17,8	13,8	33,7	19,5
14	49,9	44,8	7,4	5,5	17,4	18,6	19,6	18,7	20,0	10,9	2,8	2,1	1,0	0,8	17,4	19,7	27,7	31,3

N: número de participantes. SM: esfingomielina. Unidades de medida: nmol/L.

Apêndice E – Manuscritos para publicação

Title: Physical training, mitochondrial oxidative phosphorylation capacity and UCP1 expression of adipose tissue from women with obesity

Authors: Camila Fernanda Cunha Brandão¹, Flavia Giolo de Carvalho², Anderson de Oliveira Souza³, Márcia Varella Morandi Junqueira-Franco¹, Gabriela Batitucci Miranda², Carlos Antonio Couto-Lima³, Carlos Alexandre Fett⁴, Marcelo Papoti², Ellen Cristini de Freitas², Luciane Carla Alberici³, Julio Sérgio Marchini¹.

¹*Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil*

²*School of Physical Education and Sports of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil*

³*School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil*

⁴*Physical Education Faculty, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.*

Keywords: Human energy metabolism, white adipose tissue, physical training, mitochondria, obesity, UCP1, citrate synthase.

Running Title: Physical training and mitochondrial respiration

Corresponding author: Camila Fernanda Cunha Brandão

e-mail: camilafbrandao@hotmail.com

Address: Internal Medicine Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

Clinical trial registration: clinicaltrials.gov (NCT03119350).

Funding Sources

This work was supported by CNPq (National Council of Scientific and Technological Development – process 306824/2006-0 and 424893/2016-9), FAEPA-HCFMRP-USP, CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil), FAPESP (Foundation for Research Support of São Paulo – process 2017/10080-2).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author's Contributions

JSM, LCA, and CFCB conceived and designed the study. CFCB, FGC, GBM, and ECF performed data collection. ASO and CACL measured adipose tissue data. CFCB and MVMJF analyzed clinics data. MP and CAF designed performance data. CFCB performed statistical analysis. CFCB, LCA, and MVJF drafted the manuscript. JSM and LCA reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Abbreviations: WAT, white adipose tissue; ATP, adenosine triphosphate; BMI, body mass index; RMR, resting metabolic rate; V_{O_2} , volume of oxygen consumption; V_{CO_2} , volume of carbon dioxide consumption; Vmax, maximum velocity; RM, maximum repetition test; HR, heart rate; RPE, rating of perceived exertion; CS activity, citrate synthase activity, UCP1, uncoupling protein 1; FM, fat mass; FFM, fat free mass; RQ, respiratory coefficient.

Abstract

Objective: To evaluate white adipose tissue mitochondrial parameters from women with obesity before and after physical training program.

Methods: Women (n= 14, BMI 33 ± 3 kg/m², 35 ± 6 years) were submitted to strength and aerobic exercises (70-90% maximum heart rate), 3 times/week during 8 weeks. All subjects were paired evaluated, before and after training for resting metabolic rate (RMR), substrate oxidation (lipid and carbohydrate) by indirect calorimetry, deuterium oxide body composition and aerobic maximum velocity (Vmax) test. It also collected abdominal subcutaneous adipose tissue to analyze: mitochondrial respiration by High-Resolution Respirometry, mitochondrial content by citrate synthase (CS) activity and expression of the

UCP1 gene by Real-time qPCR.

Results: Combined physical training increased RMR, lipid oxidation, and Vmax but did not change body weight/composition. In WAT, exercise increased CS activity and decreased mitochondrial leak (V_{OLIGO}/V_{CCCP}) as well as UCP1 mRNA. RMR and lipid oxidation were positively correlated with CS activity and inversely correlated with mitochondrial leak; RQ was positively correlated with mitochondrial leak and inversely correlated with CS activity.

Conclusion: Physical training, independent of body composition changes, improves mitochondrial efficiency in WAT from women with obesity, enhancing mitochondrial density and coupling degree, which can be associated with better body metabolic rates and fat oxidation.

Introduction

Excessive white adipose tissue (WAT) lipid storage (obesity) is an important health risk factor (1). WAT is considered energetically inert, but requires sufficient ATP from functional mitochondria (2). Adipocyte mitochondrial content and oxidative capacity in human with obesity are reduced compared to non-obesity (3). Physiological processes associated with positive energy balance are associated with corresponding changes to mitochondrial architecture (fragmentation) and decreased coupling (4). The mitochondrial efficiency of ATP production (coupling degree) is determined by basal permeability of the inner membrane to protons, which accounts for a substantial portion of the energetic metabolism (5).

Parallely, physical training increases energy metabolism due to high muscular oxygen consumption, WAT lipolysis and free fatty acid mobilization (6). Human WAT expression of oxidative markers and mitochondrial content are higher in active than sedentary individuals (7). Animal WAT studies demonstrate that exercise results in marked effects on mitochondrial gene expression and activity (8-10). In addition, exercise training increases thermogenesis and oxidative capacities in rodent WAT (8). However, these effects are not well established in WAT from human with obesity and, to our knowledge, only a few protocols work with WAT mitochondria.

Therefore, we aimed to assess the mitochondrial oxidative capacity from WAT of women with obesity by evaluating its oxygen consumption, mitochondrial content, gene expression before and after physical training program. Apart from this, we intend to look at the relationship between changes of mitochondrial function, resting metabolic rate and physical performance.

Materials and Methods

Patients and study design

Twenty females (BMI 33 ± 3 kg.m², 35 ± 6 years old) without others metabolic diseases and drug consumption were chosen (convenience sampling). All subjects were clinically evaluated before and after intervention. The training intervention program lasted 10 weeks (2 weeks of adaptation of exercises and physical tests and 8 weeks of physical training). During the program, 6 volunteers gave up (2 became ill not related to the physical training and 4 abandoned the study), remaining 14 subjects. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital from the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (protocol number: 1387.040/2016), and registered in ClinicalTrials.gov (NTC 03119350). All subjects gave written consent for participation.

Body composition and anthropometric data

All participants 8h fasted for evaluation. Body weight was measured by electronic platform Fiziola™ scale with a precision of 0.1 kg and maximum capacity of 300 kg. A rigid vertical shaft with 0.5 cm graduation was used to measure body height. The body composition was evaluated with deuterium oxide dilution method, each volunteer having received a dose of 1 mL.kg⁻¹ 7% deuterium oxide (Cambridge Isotope, USA). Urine samples were collected before and three hours after dose intake. Samples were stored at -80°C until analysis. Deuterium enrichment in urine samples were determined by mass spectrometry (Europa Scientific Hydra System™, Cheshire, United Kingdom), the body composition was determined according to Schoeller *et al.* (11)

RMR and substrate oxidation

An indirect calorimetry on the QUARK-RMR (COSMED®, Rome, Italy) was used. During the evaluation, the women lay awake in the supine position in a quiet room at a temperature between 21 and 24°C, under weak lighting. All the measurements were accomplished from 8:00 to 10:00 am. The women were advised to fast for 8 hours, not to do any physical exercise, and not to drink coffee or black tea 24 h before the assessment. The equipment was automatically calibrated with known gas concentrations before all the assessments, according to the manufacturer's specifications. The volume of oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) and carbon dioxide production ($\dot{V}CO_2$) was measured for 30 min. The measurements obtained in the first 10 minutes were discarded, to ensure that the participant reached a steady state (12). The Weir

equation was used to estimate RMR. The Frayn equation (13) was used to calculate the carbohydrate and fat oxidation rates (13,14).

Performance Test

All tests were performed before and after intervention. The aerobic performance was evaluated by adapted incremental Shuttle walking test (15). The test starting at 4 km/h, increasing 0.17 m/s every three minutes (stage), and interrupted when subjects could not maintain the determined rhythm. After each stage (three minutes) 25 μ L of blood were collected to determine the lactate threshold. Lactate was analyzed by electrochemical lactometer (Yellow Springs™ Instruments model 1500 Sport, Ohio, USA) (16). The velocity of threshold 2 was determined and maximum velocity (V_{max}) calculated by Kuipers *et al* (17). In addition, maximum heart rate (HR) was determined during an aerobic test. The determination of workload in each exercise was evaluated by the maximum repetition test (RM) according to Brown *et al* (18). Yet, it was used RM of back muscle (upper limbs) and RM of the quadriceps muscle (lower limbs) as strong performance.

Physical Training Intervention

The intervention was executed in a gym of University of São Paulo, 100% supervised and it was necessary participation at least 60% total days of training. The combined physical training (alternating strength and aerobic exercise), consisted of 15 stations of resisted exercises (for all the main muscle groups) for 30 seconds (10 to 20 repetitions per exercise) alternated with 30 seconds of jogging (19). The intervention had the duration of 8 weeks, a frequency of 3 times/week with 60 min/day of duration, and intensity of 70 to 90% of HR and RM (2 weeks of 70 at 75%, 4 weeks of 75 at 85% and 2 weeks of 85 at 90%). The intensity of training was controlled by heart frequency meter (Polar®) and rating of perceived exertion (RPE) by Foster (20).

Subcutaneous adipose tissue collection

White adipose tissue was collected by biopsy from upper abdominal right quadrant, above the umbilicus. Tissue collected was divided into two parts: 1. immediate analysis of mitochondrial respiration (oxygen consumption); 2. Stored in free RNA tubes at -80 °C for of gene expression analyses.

Oxygen consumption

The sample of adipose tissue (~50 mg tissue) was homogenized in 1 mL buffer for *ex vivo* tissue maintenance (BIOPS, 2.77 mM Ca^{2+} -EGTA, 7.23 mM EGTA, 6.56 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mM taurine, 15 mM phosphocreatine, 20 mM imidazole, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 50 mM 2-[N-morpholine]ethanesulfonic acid (KMES) and 5.77 mM ATP) plus 1 $mg \cdot mL^{-1}$ of saponine during 10 minutes in 100 rpm. Posteriorly, the samples were added in 2 mL MiR05 respiration buffer (20 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 110 mM sucrose, 20 mM taurine, 60 mM K-lactobionate, 0.5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$, 1 g/L fatty acid-free BSA, pH 7.1) at 37°C and 900 rpm, and oxygen consumption was monitored using a High-Resolution Respirometer (OROBOROS Oxygraph™) equipped with DatLab 5.0 (OROBOROS, Innsbruck, Austria) for data acquisition (2-sec-time intervals) and analysis. Respiration rates at phosphorylating state were determined in the presence of exogenous NAD^+ -linked substrates (mix, 1.5 mM pyruvate, 0.28 mM malate, 1.3 mM glutamate) and 240 μ M ADP (V_{ADP}). Then, non-phosphorylating (V_{OLIGO}) and uncoupled (V_{CCCP}) respiratory states were determined after addition of 0.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ oligomycin and 0.50 μ M (titration) until 2 μ M, respectively. The oxygen consumption not related to the mitochondrial electron transport chain (V_{AA}) was determined using 0.6 $\mu g \cdot mL^{-1}$ antimycin A (**Supplementary Figure S1**). Respiratory rates were normalized by protein concentration determined by Bradford method (21). The value of V_{AA} was subtracted from the rates in others respiratory states.

Citrate synthase (CS) activity

The samples have submitted a homogenization followed by centrifugation in triethanolamine-HCl buffer (0.1 M) pH 8, to disrupt mitochondrial membranes. Then, the homogenates were centrifuged at 12000xg for 10 min at 4°C, the supernatant collected and protein concentration determined (Bradford method) (21). The reaction (10 min) was started by adding 20 μ g protein to ~160 μ L triethanolamine-HCl buffer. CS activity was measured spectrophotometrically according to Srere²² using a Model Cary 50MPR Varian Spectrophotometer (Varian Ltd., Melbourne, Australia). The CS activity was calculated by the following equation: Units ($\mu mol \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$) = $((\Delta A_{412}) / min \times V (mL) / \epsilon^{mM} \times L (cm))$, where A_{412} is the absorbance of TNB in 412 nm, V (mL) is the reaction volume (mL), ϵ^{mM} is the extinction coefficient of TNB which is 13.6 $mM^{-1} cm^{-1}$ and, L (cm) path length for absorbance measurement. Each sample was run in quintuplicate and the absorbance values were expressed per total amount of protein in the sample (22).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

For the RT-qPCR, isolation of total RNA was performed using Tri Reagent (Sigma-Aldrich™, St. Louis, USA) according to the manufacturer's specification. The High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, California, USA) was used for the reverse-transcription reaction in accordance with the manufacturer's protocol. qPCR reactions were performed mostly in three technical replicates in a 96-well plate (Applied Biosystems™, California, USA) with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI-USA). The primer sequences used are UCP1: F- 5' TGTCTGGGAACAATCACCG 3'; R-5' TCCAGGATCCAAGTCGCAAG 3', previously described primers (23). GAPDH (F- 5'AGACACCATGGGAAGGTGA 3' and R-5'TGGAATTTGCCATGGGTGGA 3') were used as reference genes. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to compare the expression levels (24).

Statistical analysis

Descriptive statistics consisted of mean values and standard errors. Data normality verified by the Shapiro-Wilk test. Then, paired t-test or Wilcoxon test were used to compare data before and after interventions. The Pearson or Spearman test was used for correlation. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. All analyses were performed with GraphPad™ Prism version 5 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

Body composition and physiological parameters

After 8 weeks of combined physical training, body weight, body mass index (BMI), fat mass (FM) and fat-free mass (FFM) did not change ($p > 0.05$), however resting metabolic rate (RMR) and lipid oxidation rate increased by 38% and 73%, respectively ($p < 0.05$). Carbohydrate oxidation rate and respiratory coefficient (RQ) decreased by 42% and 7%, respectively ($p < 0.05$). The V_{max} (aerobic performance), strength upper limbs and lower limbs (strength performance) increased by 9%, 36% and 138% ($p < 0.05$) (**Table 1**).

Mitochondrial content and metabolism from white adipose tissue (WAT)

Mitochondrial content and oxygen consumption were monitored in the biopsies of WAT tissue before and after the training period. Citrate synthase (CS) activity, a classical and reliable marker of mitochondrial content, increased after training ($p < 0.0001$) (**Figure 1A**), indicating stimulated mitochondrial biogenesis. Respiratory rates per mg of protein in states of phosphorylation (V_{ADP}), non-phosphorylating (V_{OLIGO}) and non-coupled (V_{CCCP}) (**Figures 1B, 1C, and 1D**, respectively) did not change. These respiration rates allowed the calculation of the flux control ratios (FCR) information about respiratory control independent of mitochondrial content and cell size: V_{ADP}/V_{OLIGO} (coupling as a function of the phosphorylation system) increased 44% ($p > 0.05$, not statistically different, **Figure 1E**) while V_{OLIGO}/V_{CCCP} (proton leak as a fraction of electron transport system capacity) decreased (42%, $p < 0.0001$, **Figure 1F**), indicating enhanced coupling degree after training period. This mitochondrial parameter is frequently associated with uncoupling proteins (UCPs) activity. The main UCP expression isoform in WAT was found reduced after physical training (**Figure 2**). Together these results indicate that physical training enhances mitochondrial density and coupling degree, improving mitochondrial efficiency in WAT.

Correlations between body and mitochondrial parameters from WAT

We found a positive correlation between RMR and FFM ($r = 0.552$, $p = 0.002$), showing the importance of fat-free mass (mainly muscles) to maintain resting metabolic rates (**Supplementary Figure S2**). The RMR and lipid oxidation were inversely correlated with mitochondrial leak (V_{OLIGO}/V_{CCCP}) but positively correlated with CS activity (**Table 2**). In addition, RQ was positively correlated with mitochondrial leak (V_{OLIGO}/V_{CCCP}) but inversely correlated with CS activity, as well as body CHO oxidation was also inversely correlated with CS activity. These results indicate that the mitochondrial density and coupling degree in WAT are important components of the body resting metabolic rates and fat oxidation. Yet, physical performance (V_{max}) presented a positive correlation with CS activity and negatively correlates with a mitochondrial leak (V_{OLIGO}/V_{CCCP}). In addition, we found a positive correlation between V_{max} and RMR or lipid oxidation, an inverse correlation with RQ and CHO oxidation (**Table 2**), demonstrating the training effects on body energy metabolism. Lastly, a correlation between mitochondrial FCRs and UCP1 mRNA expression in WAT were performed (**Figure 3**). As expected, UCP1 expression was inversely correlated with V_{ADP}/V_{OLIGO} (phosphorylation coupling) ($r = -0.684$, $p = 0.001$) but positively correlated with V_{OLIGO}/V_{CCCP} (leak) ($r = 0.676$, $p = 0.002$), indicating that this protein controls the coupling degree of mitochondria in WAT.

Discussion

Our 8 week of combined physical training protocol augmented resting metabolic rate, lipid oxidation, and physical training performance without changing body weight or fat mass in women with obesity. In agreement, Kong *et al* (25) found similar results in women with obese/overweight after 5 weeks of interval and continuous aerobic training (25). The absence of effects on body weight and fat mass may be attributed to: 1) the duration of training period, since some studies have found significant weight loss only after 10 weeks, as found after strength and aerobic training in obese/overweight women (26,27); or 2) an increase of energy intake, although we have emphasized to keep constant food intake to the subjects. Because of this, we did not accurately collect this information. By the way, the body metabolic changes found here improve strength and aerobic performance, related to health (19) and can act against comorbidities associated to obesity (28).

Our results also clearly show that physical exercise promotes metabolic adaptations in WAT of women with obesity, as previously shown in rodents (8). The dynamic control of biogenesis and respiratory function of mitochondria mainly depends on the peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α (PGC-1 α), which is activated and increased by physical exercise, thus increasing mitochondrial β -oxidation (29). We show here, that after 8 weeks of physical training improves mitochondrial oxidative phosphorylation capacity by WAT enhancing mitochondrial density (CS activity) and coupling degree (low leak) related to UCP1 mRNA expression.

This effect seems to be dependent of intervention time, since after 10 days of endurance exercise a shift from carbohydrate to fat oxidation during submaximal exercise was reached, but changes in oxidative markers in subcutaneous WAT were not found (30). Improvements in WAT oxidative capacity were absent in healthy and untrained individuals even after 6 to 12 weeks of training (31,32). But, clearly in individuals with obesity, after exercise training as found here, and after bariatric surgery massive weight loss, in which an improved mitochondrial respiration and phosphorylation capacity was found after 18 months (33). As in WAT, bariatric surgery also increase in mitochondrial coupling and ATP generation in skeletal muscle (34), a known effect of physical training in this tissue (35-37), suggesting a metabolic link between these organs, or the effects of bariatric surgery are related to a shift to a less sedentary lifestyle. Studies in skeletal muscle had shown that mitochondrial respiration is lower in individuals with obesity compared to normal weight (38).

Here, increments in mitochondrial density and coupling degree in WAT were found as important components of the body resting metabolic rates and fat oxidation. Improvements in resting metabolic rates are directly associated with fat free mass and glucose/insulin tolerance (39). Effects that can be promoted by exercise training in addition to other metabolic changes in WAT, such as reductions in adipocyte size and lipid content, changes in the expression of several proteins and cytokine release (8, 10). Besides, increases in mitochondrial capacity in WAT may enhance lipid oxidation and break fat storage (40). We confirm these data, from the reduction of RQ with values ranges from 0.75 to 0.70 (fat oxidation) (41).

The mitochondrial changes found here in WAT were also associated with physical performance. These are well established effects of exercise on skeletal muscle, in which the activity of CS was positively correlated to VO₂max (42,43), mitochondrial number, volume, enzyme content and respiratory capacity increase linearly in response to training, and are elevated in trained versus untrained individuals (35, 44, 45).

Conclusion

This study clarifies that 8 week of combined physical training (alternating 30 sec strength and 30 sec aerobic exercise, 3 times/week, 60 min/day, at 70 to 90% of HR and RM) improves mitochondrial oxidative phosphorylation capacity, enhancing mitochondrial density and coupling degree related to UCP1 mRNA expression in WAT of women with obesity. These mitochondrial changes are related to increments in physical performance, body resting metabolic rates and lipid oxidation, independent of body weight loss.

Acknowledgments

The authors thank Thays de Vasconcelos Gomes for expert assistance in biopsy of adipose tissue.

Data sharing statement: None data will be sharing in clinical trials. It is registered in clinical trials: study protocol, objectives and methods of evaluation.

References

1. Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 195-213.
2. Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function

- in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 2007; 56: 2973–2981.
3. Yin X, Lanza IR, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte Mitochondrial Function Is Reduced in Human Obesity Independent of Fat Cell Size. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E209–E216.
4. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 2013; 17:491-506.
5. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* 2010; 47: 53–67.
6. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E495-504.
7. Pino MF, Parsons SA, Smith SR, Sparks LM. Active individuals have high mitochondrial content and oxidative markers in their abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity* 2016; 24: 2467-2470.
8. Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, Lee MY, Takahashi H, So K, et al. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes* 2015; 64:2002-2014.
9. Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SA, Wright DC. Exercise and adrenaline increase PGC-1alpha mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol* 2009; 587:1607-1617.
10. Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes* 2014; 63: 2800-2811.
11. Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, Jéquier E. Energy expenditure by doubly labelled water: validation in humans and proposed calculations. *Am J Physiol* 1986; 250:R823-830.
12. Weijs PJ, Vansant GA. Validity of predictive equations for resting energy expenditure in Belgian normal weight to morbid obese women. *Clin Nutr* 2010; 29: 347–351.
13. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 1983; 55: 628-634.
14. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 1949; 109: 1-9.
15. Singh SJ, Morgan MD, Scott S, Walters D, Hardman AE. Development of a shuttle walking test of disability in patients with chronic airways obstruction. *Thorax* 1992; 47: 1019-24.
16. Medbo JI, Mamen A, Holt Olsen O, Evertsen F. Examination of four different instruments for measuring blood lactate concentration. *Scan J Clin Lab Invest* 2000; 60: 367-80.
17. Kuipers H, Verstappen FT, Keizer HA, Geurten P, Van Kranenburg G. Variability of Aerobic Performance in the Laboratory and Its Physiologic Correlates. *Int J Sports Med* 1985; 6: 197-201
18. Brown LE, Weir JP. ASEP procedures recommendation i: accurate assessment of muscular strength and power. *J Exerc Physiol* 2001; 4: 1-21, 2001.
19. Fett CA, Fett WCR, Marchini JS. Level of Overweight/Obese Women After 08 Weeks of Aerobic or Mixed Metabolism Exercises. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2009; 11: 261-266.
20. Foster C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 1164-1168.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 72, 248-254
22. Srere PA. Citrate Synthase. *Method Enzymol* 1969; 13: 3-11.
23. Barbagallo I, Vanella L, Cambria MT, Tibullo D, Godos J, Guarnaccia L, et al. Silibinin regulates lipid metabolism and differentiation in functional human adipocytes. *Front Pharmacol* 2016; 6: 309.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 2001; 25; 402–408.
25. Kong Z, Sun S, Liu M, Shi Q. Short-Term High-Intensity Interval Training on Body Composition and Blood Glucose in Overweight and Obese Young Women. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 4073618.
26. Ferreira FC, Bertucci DR, Barbosa MR, Nunes JE, Botero JP, Rodrigues MF, et al. Circuit resistance training in women with normal weight obesity syndrome: body composition, cardiometabolic and echocardiographic parameters, and cardiovascular and skeletal muscle fitness. *J Sports Med Phys Fitness* 2016; 57: 1033-1044.
27. Tan S, Wang J, Cao L, Guo Z, Wang Y. Positive effect of exercise training at maximal fat oxidation intensity on body composition and lipid metabolism in overweight middle-aged women. *Clin Physiol and Funct Imaging* 2016; 36: 225-230, 2016.
28. Kennedy AB, Lavie CJ, Blair SN. Fitness or Fatness: Which Is More Important? *JAMA* 2018; 319: 231-232.
29. Pardo R, Enguix N, Lasheras J, Feliu JE, Kralli A, Villena JÁ. Rosiglitazone-induced mitochondrial

- biogenesis in White adipose tissue is dependent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *Plos one* 2011; 6: e26989.
30. Camera DM, Anderson MJ, Hawley JA, Carey AL. Short-term endurance training does not alter the oxidative capacity of human subcutaneous adipose tissue. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 307-16.
31. Larsen S, Danielsen JH, Sondergaard SD, Sogaard D, Vigelsoe A, Dybbøe R, et al. The effect of high-intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2015; 25: e59-e69.
32. Vosselman MJ, Hoeks J, Brans B, Pallubinsky H, Nascimento EB, Van Der Lans AA, et al. Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. *Int J Obes* 2015; 39: 1696–1702.
33. Hansen M, Lund MT, Gregers E, Kraunsoe R, Van Hall G, Helge JW, et al. Adipose tissue mitochondrial respiration and lipolysis before and after a weight loss by diet and RYGB. *Obesity* 2015; 23: 2022-2029.
34. Fernström M, Bakkam L, Loogna P, Rooyackers O, Svensson M, Jakobsson T, et al. Improved Muscle Mitochondrial Capacity Following Gastric Bypass Surgery in Obese Subjects. *Obes Surg* 2016; 26: 1391-7, 2016.
35. Perry CGR, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010; 588: 4795–4810.
36. Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, et al. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2008; 104: 1436–1441.
37. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Hickner RC, Neufer PD. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol* 2008; 586: 151–160.
38. Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E49-58.
39. Davis RAH, Halbrooks JE, Watkins EE, Fisher G, Hunter GR, Nagy TR, et al. High-intensity interval training and calorie restriction promote remodeling of glucose and lipid metabolism in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; 313: E243-E256.
40. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, Shah J, Zafar N, et al. Metabolic remodeling of white tissue in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307: E262-277.
41. Fassini PG, Silvah JH, Lima CMM, Brandão CFCM, Wichert-Ana L, Marchini JS, et al. Indirect Calorimetry: From Expired CO₂ Production, Inspired O₂ Consumption to Energy Equivalent. *J Obes Weight Loss Ther* 2015; S5: 001-003.
42. Vigelso A, Andersen NB, Dela F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2014; 6: 84-101.
43. Guadalupe-Grau A, Fernández-Elías VE, Ortega JF, Dela F, Helge JW, Mora-Rodriguez R. Effects of 6-month aerobic interval training on skeletal muscle metabolism in middle-aged metabolic syndrome patients. *Scand J Med Sci Sports* 2018; 28: 585-595.
44. Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* 2008; 57: 2933–2942.
45. Larsen RG, Callahan DM, Foulis SA, Kent-Braun JA. In vivo oxidative capacity varies with muscle and training status in young adults. *J Appl Physiol* 2009; 107: 873–879.

Table 1. Body Composition, resting metabolic and substrate oxidation rates, and physical performance before and after 8 weeks of physical training.

Variables	Before	After	<i>p</i> value
BMI (kg.m ²)	33 ± 1	33 ± 1	0.150
Weight (kg)	86 ± 2	87 ± 3	0.169
FM (kg)	40 ± 1	39 ± 2	0.628
FFM (kg)	46 ± 2	48 ± 2	0.190
RMR (Kcal.day ⁻¹)	1415 ± 120	1790 ± 52	<0.001
Lipid Oxidation (g.day ⁻¹)	121 ± 32	189 ± 51	<0.001
CHO Oxidation (g.day ⁻¹)	72 ± 19	-10 ± -3	0.004
RQ (Vco ₂ .Vo ₂ ⁻¹)	0.75 ± 0.2	0.70 ± 0.2	<0.001
Vmax (km.h ⁻¹)	6.9 ± 0.1	7.6 ± 0.2	0.005
Upper limbs (kg)	45 ± 2	60 ± 3	<0.001
Lower limbs (kg)	36 ± 6	68 ± 5	0.001

Data expressed as mean and standard errors (M ± SE). BMI: Body mass index. FM: Fat mass. FFM: Fat-free mass. RMR: Resting metabolic rate. CHO Oxidation: Carbohydrate Oxidation. RQ: Respiration coefficient. Vmax: maximum velocity. Upper limbs: RM test of back muscle. Lower limbs: RM test of quadriceps muscle.

Table 2. Correlation coefficient between Vmax, Leak (Pearson) and CS activity (Spearman) with body parameters.

	Vmax (km.h ⁻¹)		Leak (V _{OLIGO} .V _{CCCP} ⁻¹)		CS activity (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
RMR (Kcal.day ⁻¹)	0.375	0.049	-0.513	0.005	0.422	0.025
Lipid Oxidation (g.day ⁻¹)	0.521	0.004	-0.549	0.003	0.605	0.001
CHO Oxidation (g.day ⁻¹)	-0.473	0.011	0.303	<i>n.s</i>	-0.460	0.011
RQ (Vco ₂ .Vo ₂ ⁻¹)	-0.550	0.002	0.382	0.045	-0.538	0.003
Vmax (km.h ⁻¹)	-	-	-0.530	0.004	0.581	0.001
CS activity (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	0.581	0.001	-0.696	<0.0001	-	-
Leak (V _{OLIGO} .V _{CCCP} ⁻¹)	-0.530	0.004	-	-	-0.696	<0.0001

RMR: Resting metabolic rate. CHO Oxidation: Carbohydrate Oxidation. RQ: Respiration coefficient. Vmax: maximum velocity (aerobic performance). Leak: flux control ratio. CS activity: Citrate synthase activity. N= 28 subjects (before and after samples merged). *n.s*: not significant.

Figures

Figure 1. Mitochondrial content and respiratory states in white adipose tissue (WAT). Before (black symbols) and after (white symbols) physical training intervention. Citrate synthase (CS) activity (A); Respiration rates in states of phosphorylation (B), non-phosphorylating (C) and non-coupled (D) and flux control ratios (FCR) of V_{ADP}/V_{OLIGO} (E) and V_{OLIGO}/V_{CCCP} (F). Data were presented as mean ± standard deviations. N= 14 subjects.

Figure 2. Expression of UCP1 genes in white adipose tissue (WAT). Before (black symbols) and after (white symbols) physical training intervention. N= 9 subjects.

Figure 3. Correlations between mitochondrial parameters of WAT. Expression of UCP1 genes correlated with the index of mitochondrial coupling (V_{ADP}/V_{OLIGO}) (A) and leak (V_{OLIGO}/V_{CCCP}) (B). Black symbols: before the intervention; White symbols: after intervention. N= 9 subjects. Numbers indicate the participants. Groups were merged for analysis.

Supplementary Material

Figure S1. Determination of mitochondrial respiratory states of white adipose tissue. Subcutaneous adipose tissues (~50 mg) were incubated in BIOPS solution containing saponine. Posteriorly, the samples were submitted to oxygen consumption monitoring in 2 mL MiRO5 respiration buffer, as described in material and methods. Arrows indicate addition of mix of substrates (1.5 mM pyruvate, 1.3 mM glutamate and 0.28 mM malate), ADP (0.24 mM), oligomycin (0.5 μ g/mL), CCCP (0.5 μ M each addition) and antimicina A (AA, 0,6 μ g/mL) to determine the rates of phosphorylating (V_{ADP}), non-phosphorylating (V_{OLIGO}), non-coupled (V_{CCCP}) and non-mitochondrial (V_{AA}).

Figure S2. Pearson correlation between resting metabolic rate (RMR) and fat free mass (FFM). Back symbols: before physical training intervention. White symbols: after physical training intervention. n= 14 subjects. Numbers indicate the participants. Groups were merged for analysis.

Title: Cardiovascular risk biomarker Trimethylamine-N-oxide (TMAO) negatively correlates with fat free mass in obese women

Running Title: Trimethylamine-N-oxide and Fat Free Mass

Camila Fernanda Cunha Brandão¹, Julio Sérgio Marchini¹, Audrey Aguesse², Bruno Affonso Parenti de Oliveira¹, Marcela Augusta de Souza Pinhel¹, Flávia Giolo de Carvalho³, Márcia Varella Morandi Junqueira-Franco¹, Carla Barbosa Nonino¹, Wilson Salgado Junior¹, Ellen Cristini de Freitas³, Stéphanie Billon-Crossouard², Michel Krempf², Mikaël Croyal².

¹Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

²CRNHO, West Human Nutrition Research Center, Inra UMR 1280 PhAN, Mass Spectrometry Core Facility, F-44000 Nantes, France.

³School of Physical Education and Sports of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Corresponding author: Camila Fernanda Cunha Brandão

e-mail: camilafrbrandao@hotmail.com

Address: Internal Medicine Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil.

Abstract

Background – Trimethylamine (TMA) originates from gut microbiota metabolism, and is converted into the liver to Trimethylamine-N-oxide (TMAO) by flavin-containing monooxygenases. TMAO has been identified as biomarker of cardiovascular risk like atherosclerosis. Previous reports showed increased TMAO plasma concentrations after bariatric surgery but the related mechanisms are unclear. A recent study suggested that high fat mass correlates with high TMAO plasma value.

Objective – To analyze the impact of contrasted changes of body composition after bariatric surgery and physical training in obese patients on plasma TMAO concentrations.

Methods – Plasma TMAO concentrations were measured by mass spectrometry and body composition was estimated by bioimpedance and deuterium oxide in two groups of patients: 10 obese females, before and after 6 months of bariatric surgery, and 14 obese females, before and after 2 months of physical training. Sex hormones, as potential modulators of body composition, were measured by standard ELISA.

Results – Significant reductions of body weight (25%, $p < 0.0001$), fat mass (39%, $p < 0.0001$) and fat free mass (11%, $p < 0.0001$), besides significant increases of plasma TMAO (+100%, $p = 0.01$) and testosterone (92%, $p = 0.002$) have been shown after bariatric surgery. In contrast, physical training showed a significant decrease of plasma TMAO (-16%, $p = 0.05$) with no significant changes of body composition and sex hormones. Asignificant correlation between plasma TMAO and fat free mass ($r = -0.305$, $p = 0.034$), plasma estrone ($r = -0.395$, $p = 0.005$), and plasma testosterone ($r = +0.412$, $p = 0.004$) was observed.

Conclusion – Bariatric surgery increases plasma TMAO concentrations. Changes of body composition could impact plasma TMAO levels, independently of weight loss. Differential changes in fat free mass observed with bariatric surgery and physical exercise are related to plasma TMAO. Sex hormones, especially testosterone increments, could also result in TMAO increments.

Keywords – obesity, cardiovascular risk, physical training, nutrition, body composition, TMAO.

Clinical trial registration: [clinicaltrials.gov \(NCT03119350\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03119350) and [ensaiosclinicos.gov.br \(RBR-7dkf7k\)](https://ensaiosclinicos.gov.br/BR-7dkf7k).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Introduction

Trimethylamine N-oxide (TMAO) originates from the hepatic oxidation of trimethylamine (TMA) by flavin-dependent monooxygenases (FMOs), while TMA is primarily produced by gut microbiota metabolism of carnitine, choline, choline-containing compounds and betaine.¹ TMAO has been identified as a biomarker of cardiovascular risk.² In a landmark study,^{3,4} higher plasma TMAO concentrations were associated with 50% increased of relative risk of coronary adverse events. This was in part attributed to an enhanced macrophage cholesterol deposition and/or in a decrease of return cholesterol transfer leading all together to the atherosclerosis development.²

Bariatric surgery is proposed to treat severe obese patients and allows a high rate of sustainable weight loss and a global reduction of metabolic disturbances.⁵ In addition, this treatment could be the best choice for obese patients with a high cardiovascular risk. However, it has been reported that TMAO plasma concentration increased after bariatric surgery,^{6,7} which can offset in part the cardiovascular beneficial effects. The underlying mechanisms of this increase of plasma TMAO after bariatric surgery remain unclear. It has been suggested that changes in gut microbiota and/or diet could lead to an overproduction of TMAO.⁸ It has also been proposed that post-surgery starvation could also be responsible of gut microbiota alterations and dysbiosis.⁹ Increased levels of *Escherichia coli* or *Pseudomonas*, could already convert more efficiently TMA to TMAO into the gut.⁶

Changes in body composition could contribute to the modulation of plasma TMAO concentrations. A recent study conducted in mouse reported a positive correlation between circulating levels of TMAO with body weight, fat mass (FM), mesenteric adiposity, and subcutaneous adiposity as well as a negative correlation with insulin sensitivity.¹⁰ Human studies showed meanwhile positive associations between TMAO, body mass index (BMI), and fat mass (FM),³ but none between fat free mass (FFM). Of note, study in mice showed increased FFM after inhibition of FMO3, the main isoform responsible of TMA to TMAO conversion.¹⁰ Besides, some studies showed possible associations between sex hormones (i.e. testosterone and estrone) as putative modulator of body composition and plasma TMAO.^{11,12}

From these grounds, we aimed to evaluate the modulation of plasma TMAO by differential changes in the body composition of obese women who were submitted to 2 types of treatments for weight loss (gastric bypass bariatric surgery vs physical training) and the potential role of sex hormones.

Materials and Methods

Patients and study design

Twenty four young females, pre-menopausal (regular menses), were enrolled and divided in two groups. Ten of them (BMI: 41.9 ± 7.0 kg/m², 32.2 ± 6.1 years old) were subjected to a Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) surgery (BS group). Blood samples were collected before and 6 months after intervention in this group. The remaining 14 subjects (BMI: 32.7 ± 2.5 kg/m², 34.5 ± 5.9 years old) were evaluated before and after 2 months of combined physical training (strength and aerobic exercise) on high intensity (75-90% of heart rate), during 3 times a week with 55 minutes per session (PT group).¹³ All subjects had no other diseases and regular menstruations. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocol number: 9201/2013 and 1387.040/2016) and all subjects gave written consent for participation.

Body composition and anthropometric data

All participants were in fasting state for evaluation. Body weights were measured with an electronic platform Fiziola TM scale with precision of 0.1 kg and maximum capacity of 300 kg. A vertical shaft with 0.5 cm graduation was used to measure body height. The waist circumference was measured with an inextensible tape at the largest circumference between the last rib and the iliac crest. The body compositions of BS group were measured with a monofrequency Quantum BIA 450Q-RJL System analyzer (Biodinamics®, Seattle, Washington, USA). Resistance and reactance values were placed in particular equation validated for the obese population of this study.¹⁴ For PT group, body compositions were evaluated with deuterium oxide dilution method, each volunteer having received a dose of 1 mL.kg⁻¹ of 7% deuterium oxide (Cambridge Isotope, Tewksbury, MA, USA). Urine samples were collected before and three hours after dose intake. Samples were stored at -80°C until analysis. Deuterium enrichments in urine samples were determined by mass spectrometry (Europa Scientific Hydra System, Cheshire, United Kingdom) and the body composition was determined as previously described.¹⁵

Biochemical measurements

Blood samples were collected after a 12-h fasting in heparin tubes, and plasma were separated by centrifugation and stored at -80°C until analysis. Creatinine was analyzed by Labtest Kit® (Labtest Diagnóstica S.A, Minas Gerais, Brazil) based on the Jaffe reaction, that is, under alkaline conditions creatinine reacts directly with picric ions forming a reddish complex, at 520 nm absorbance on spectrophotometry. Sex hormones were evaluated by ELISA kits, estrone by Alpha Diagnostics International® (San Antonio, TX, USA), and testosterone by Cayman Chemical® (Ann Arbor, MI, USA) according to manufacturer's instructions.

TMAO and its precursors (betaine, choline, carnitine and TMA) were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). All solvents were LC-MS grade and purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Standard compounds were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). A pool of reference standard solutions was prepared and serially diluted in acetonitrile to obtain 7 standard solutions ranging 0.05-10 µmol/L. Standard solutions

and plasma samples (20 μ L) were then extracted with 180 μ L of acetonitrile containing exogenous internal standards at 3 μ mol/L ($^2\text{H}_9$ -choline, $^2\text{H}_9$ -carnitine, $^{13}\text{C}_2$ -betaine, [$^{13}\text{C}_3$, ^{15}N]-TMA and $^2\text{H}_9$ -TMAO). Samples were mixed and centrifuged 10 min at $10,000 \times g$ (10 $^\circ\text{C}$). Supernatants were then transferred to vials for LC-MS/MS analysis that were performed on a Xevo[®] TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class[®] UPLC[™] device (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Samples (10 μ L) were injected onto a HILIC-BEH column (1.7 μ m; 2.1×100 mm, Waters Corporation) held at 30 $^\circ\text{C}$, and compounds were separated with a linear gradient of mobile phase B (98% acetonitrile, 0.1% formic acid) in mobile phase A (10 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid) at a flow rate of 400 μ L/min. Mobile phase A was kept constant from 1 min at 1%, linearly increased from 1% to 45% for 6.5 min, kept constant for 0.5 min, returned to the initial condition over 1.5 min, and kept constant for 2.5 min before the next injection. Targeted compounds were then detected by the mass spectrometer with the electrospray interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 1.5 kV; desolvation gas (N_2) flow and temperature, 650 L/h and 350 $^\circ\text{C}$; source temperature, 150 $^\circ\text{C}$). The multiple reaction monitoring modes was applied for MS/MS detection as detailed in **Supplementary Table S1**. Chromatographic peak area ratios between unlabeled compounds and their respective internal standards constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for quantification. The linearity was expressed by the mean r^2 which was greater than 0.998 for all compounds (linear regression, 1/x weighting, origin excluded). The intra- and inter-assay imprecisions were below 9.7% for all compounds. Recoveries were assessed with internal standards and were greater than 96%. Of note, endogenous TMAO was not detected in most samples and therefore not documented here.

Statistical analyses

Descriptive statistics consisted of mean values and standard deviations. Data normality was checked by the Shapiro-Wilk test. Then, paired t test or Wilcoxon test were used to compare data before and after interventions. Unpaired t test was used to compare baseline of groups. The Pearson test was used for correlations. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. All analyses were performed with GraphPad Prism version 5 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

Effects of interventions on body composition

The main characteristics of patients are shown in **Table 1**. As expected, bariatric surgery decreased significantly BMI (-25%, $p < 0.0001$), FM (-39%, $p < 0.0001$) and FFM (-12%, $p < 0.0001$), while physical training only decreased slightly but significantly waist circumference (-3%, $p = 0.008$) and increased the FFM (+4, $p > 0.05$).

Plasma TMAO and precursors

At baseline, plasma TMAO concentrations were significantly higher in subjects selected for physical training (8.2 ± 6.4 vs 3.4 ± 1.9 μ mol/L, $p = 0.005$), while no significant difference was noticed for betaine, choline and carnitine (**Table 2**). As shown in **Figure 1**, bariatric surgery significantly increased plasma TMAO (+100%, 3.4 ± 1.4 vs 6.3 ± 2.1 μ mol/L, $p = 0.009$) and significantly decreased plasma carnitine (-17%, 38.7 ± 6.8 vs 31.8 ± 7.9 μ mol/L, $p = 0.021$), while no difference was shown for plasma choline (1.9 ± 0.6 vs 1.5 ± 0.3 μ mol/L) and betaine (30.9 ± 9.6 vs 30.3 ± 6.7 μ mol/L). In contrast, physical training significantly lowered plasma TMAO (-16%, 8.2 ± 6.4 vs 5.4 ± 2.8 μ mol/L, $p = 0.049$) and significantly increased plasma choline (+26%, 1.6 ± 0.2 to 2.0 ± 0.2 μ mol/L, $p = 0.0003$) while no changes were noticed for carnitine and betaine.

Plasma sex hormones and creatinine

Testosterone concentrations increased significantly by 92% ($p = 0.002$) after bariatric surgery, while no changes were measured after physical training. We did not find any significant modulations of plasma estrone and creatinine in both groups (**Table 2**).

Correlation between TMAO, fat free mass and sex hormones

As shown in **Figure 2**, the plasma TMAO concentrations were negatively correlated with the FFM ($r = -0.305$, $p = 0.034$) and estrone ($r = -0.395$, $p = 0.005$), and positively correlated with testosterone ($r = 0.412$, $p = 0.004$). Estrone and testosterone were both correlated ($r = -0.711$, $p < 0.0001$) while no significant correlations were observed between FFM, FM and sex hormones (**Supplementary Figures S1 and S2**).

Discussion

We assessed plasma TMAO modulations during two different strategies for weight loss in obese patients in order to dissect out the possible relationships with changes of body composition. We showed that body compartments changed dramatically after bariatric surgery in contrast to physical training. We found that TMAO and its main precursors displayed different behaviors between interventions, especially TMAO that significantly increased after bariatric surgery and decreased after physical training. We also found an increase of plasma testosterone after bariatric surgery and no changes after physical training. Fat free mass was also negatively correlated with plasma TMAO concentrations. Besides, we observed that TMAO positively correlated with testosterone and negatively with estrone.

The increase of plasma TMAO concentrations measured in this study after bariatric surgery is in agreement with previous findings. Study⁶ have shown 9 years after RYGB surgery an increase in plasma TMAO compared to baseline but not with Vertical Banded Gastroplasty surgery, although there was no difference in the plasma levels of choline and betaine with both procedures. Another study¹⁶ also found increases of TMAO restricted to RYGB intervention and no modulations after gastric sleeve resection. This was explained by an increase of *Pseudomonas* in the gut microflora, which has been shown to be more abundant after RYGB.⁶ On the same lines,^{17,7} found increases of TMAO after RYGB, but also after duodenal switch. In addition, it was also suggested that carnitine intake, as food supplements, could promote weight loss but also could induce TMAO production.⁸ However, in our study carnitine levels decreased after bariatric surgery ruling out this hypothesis.

In contrast, physical training reduced plasma TMAO by 16% and increased plasma choline by 26% without weight loss in sharp contrast with bariatric surgery, was observed. The response of TMAO to exercise remains controversial as some reports showed a decrease,¹⁸ or an increase¹⁹ or no changes.²⁰

We also found inverse negative correlation between fat free mass and TMAO. Also were reported associations in humans between fat free mass and visceral adipose tissue, choline and carnitine, but not with TMAO.⁷ Another study showed that before any intervention in overweight and obese patients, TMAO was positively associated with adiposity.²¹ In contrast with this study, we did not find any associations with fat mass. However, our results are in line with an animal study showing increased FFM and decreased FM and TMAO plasma concentrations after FMO3 inhibition.¹⁰

We have anticipated changes in hormonal status after exercise or weight loss and we hypothesized that this could be the link between the changes in the body composition and the plasma TMAO concentrations. It was already shown in mice a sexual dimorphism related to an enhanced activity of FMO3 in females compared to males leading to a higher conversion of TMA to TMAO.^{11,12} An overexpression and activity of FMO3 was observed and related to the estrogens while the androgens showed the opposite effect. We tested our hypothesis as a differential effect on the sex hormonal status was expected in the bariatric surgery and physical activity groups. A study conducted in obese women have already shown that increasing weight, BMI and fat mass were associated with elevation of plasma testosterone.²² A reduction of androgens has been reported after bariatric surgeries and correlations were reported between androgen changes and weight loss, insulin sensitivity or low-grade inflammation.^{23, 24}

Other studies reported opposite results as an increase of free testosterone was observed few weeks or five years after surgery including sleeve gastrectomy or gastric bypass.^{25, 26} In a recent meta-analysis achieved on 27 studies, it was reported an increase of testosterone in men and a decrease in women while estradiol decreased in both genders. These results were related to reduction of body weight, improvement in insulin sensitivity or reduction of adipogenic inflammation.²⁷ Besides, in an exercise study,²⁸ reported an expected increased FFM but they did not found changes of serum testosterone and estradiol after 9 week of strength and endurance training in overweight patients. In contrast, another study conducted in young obese females showed a reduction of plasma testosterone and estradiol, without changes of FFM after 5 weeks of physical training.²⁹ Other studies in healthy young women showed inconsistent changes on plasma testosterone and estradiol levels, including decreases,³⁰ no changes³¹ or increases,³² in response to resistance training or aerobic training.

We reported an increase of plasma testosterone after surgery and no change with physical exercise. A positive correlation between plasma TMAO and testosterone, and a negative correlation between TMAO and estrone concentrations were also observed. This is quite puzzling compared to the previous studies in bariatric surgery as a decrease of testosterone was expected. This could be explained by the low plasma concentration of testosterone at baseline suggesting a strong insulin resistance and little number of polycystic ovary syndrome in the enrolled women, who behaved as men after surgery.³³ It was previously shown that FMO3 inhibition reduced TMAO plasma concentrations.³⁴ According to the increase of testosterone, a decrease of TMAO could be expected in contrast to our results. It was already reported that FMO3 decreased in male because of a down-regulation mediated by testosterone, while female showed an increase of FMO3 expression due to estrogen.¹¹ In addition, when female mice were treated with testosterone, FMO3 activity and expression decreased³⁵ but opposite results were reported in

Japanese medaka fishes or in rat hepatocytes^{36,37} suggesting differences according to species. In humans, estrogens appeared to enhance the conversion of the TMA into TMAO but few data are available and are not all consistent.³⁸ The correlation we have observed between plasma TMAO and testosterone does not mean causality and common mechanisms could independently intervene on these two variables and body composition after bariatric surgery or physical exercise such as insulin or bile acid concentrations.^{39, 40}

This study has some limitations as the reduced number of patients and the different duration of intervention as 2 months for physical training was not able to obtain efficient changes in body composition. The method for the evaluation of body composition was not similar between groups, but there are two reliable methods tightly correlated and all the patients were analyzed as their own controls.^{42, 42} However, by pooling the two studies, it was possible to analyze differential changes of body composition and hormonal status.

In the study the associations between TMAO, fat free mass and sex hormones were analyzed. Plasma TMAO concentrations were decreased after physical exercise, and increased after bariatric surgery. These changes are related to the differential effect of the both interventions on the fat free mass as it was negatively correlated with plasma TMAO levels. An unexpected association was also found between plasma TMAO and testosterone likely due to an indirect causality effect. This finding has to be replicated in a larger set of patients and could be added to the benefits of physical activity.

Author's Contributions

JSM, CNB, MASP and MK conceived and designed the study. CFCB, BOP, ECF, WSJ and FGC performed data collection. MVMJF, AA and SC measured biochemical data. CFCB, BOP and ECF anthropometric data and body composition. CFCB and MC performed statistical analysis. CFCB, CNB and MVMJF drafted the manuscript. JSM, MK and MC reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (National Council of Scientific and Technological Development – process 306824/2006-0), FAEPA-HCFMRP-USP, CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil).

References

- 1 Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PLoS One* 2016; 11: e0141738.
- 2 Cho CE, Caudill MA. Trimethylamine-N-Oxide: Friend, Foe, or Simply Caught in the Cross-Fire? *Trends Endocrinol Metab* 2017; 28: 121-130.
- 3 Randrianarisoa E, Lehn-Stefan A, Wang X, Hoene M, Peter A, Heinzmann SS, et al. Relationship of Serum Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Levels with early Atherosclerosis in Humans. *Sci Rep* 2016; 27: 26745.
- 4 Li XS, Obeid S, Klingenberg R, Gencer B, Mach F, Räber L, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide in acute coronary syndromes: a prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *Eur Heart J* 2017; 38: 814-824.
- 5 Colquit JL, Pickett K, Loveman E, et al. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 2: CD003641.
- 6 Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Stahlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab* 2015; 22: 228–238.
- 7 Troseid M, Hov JR, Nestvold TK, Thoresen H, Berge RK, Svardal A, et al. Major Increase in Microbiota-Dependent Proatherogenic Metabolite TMAO One Year After Bariatric Surgery. *Metab Syndr Relat Disord* 2016; 14: 197-201.
- 8 Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 2014; 35: 904–10.
- 9 Ashrafian H, Li JV, Spagou K, Harling L, Masson P, Darzi A, et al. Bariatric surgery modulates circulating and cardiac metabolites. *J Proteome Res* 2014; 13: 570–580.
- 10 Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A, Ferqueson D, et al. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Rep* 2017; 19: 2451-2461.

- 11 Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metab* 2013; 17: 49–60.
- 12 Esposito T, Varriale B, D'Angelo R, Amato A, Sidoti A. Aldo Amato and Antonina Sidoti Regulation of flavin-containing mono-oxygenase (*Fmo3*) gene expression by steroids in mice and Humans. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2014; 20: 99–109.
- 13 Fett CA, Fett WCR, Marchini JS. Fitness Level of Overweight/Obese Women After 08 Weeks of Aerobic or Mixed Metabolism Exercises. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum* 2009; 11: 261–266.
- 14 Jakicic JM, Wing RR, Lang W. Bioelectrical impedance analysis to assess body composition in obese adult women: the effect of ethnicity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 243–9.
- 15 Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, Jéquier E. Energy expenditure by doubly labelled water: validation in humans and proposed calculations. *Am J Physiol* 1986; 250: R823–830.
- 16 Gralka E, Luchinat C, Tenori L, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B. Metabolomic fingerprint of severe obesity is dynamically affected by bariatric surgery in a procedure-dependent manner. *Am J Clin Nutr* 2015; 102: 1313–22.
- 17 Narath SH, Mautner SI, Svehlikova E, Shultes B, Pieber TR, Sinner FM, et al. An untargeted metabolomics approach to characterize short-term and long-term metabolic changes after bariatric surgery. *PLoS One* 2016; 11: e0161425.
- 18 Pechlivanis A, Kostidis S, Sarasilanidis P, Petridou A, Tsalis G, Mougios V, et al. (1)H NMR-based metabonomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine. *J Proteome Res* 2010; 9: 6405–16.
- 19 Wang F, Han J, He Q, Gend Z, Deng Z, Qiao D. Applying 1H NMR Spectroscopy to Detect Changes in the Urinary Metabolite Levels of Chinese Half-Pipe Snowboarders after Different Exercises. *J Anal Methods Chem* 2015; 3: 1–9.
- 20 Enea C, Sequin F, Petitpas-Mulliez J, Boildieu N, Boisseau N, Delpech N, et al. H NMR-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after acute and chronic physical exercise. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396: 1167–1176.
- 21 Heianza Y, Sun D, Smith SR, Bray GA, Sacks FM, Qi L. Changes in Gut Microbiota-Related Metabolites and Long-term Successful Weight Loss in Response to Weight-Loss Diets: The POUNDS Lost Trial. *Diabetes Care* 2018; 41: 413–419.
- 22 Sowers MF, Beebe JL, McConnell D, Randolph J, Jannausch M. Testosterone concentrations in women aged 25–50 years: Associations with lifestyle, body composition, and ovarian status. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 256–264.
- 23 Ernst B, Wilms B, Thurnheer M, Schultes B. Reduced circulating androgen levels after gastric bypass surgery in severely obese women. *Obes Surg* 2013; 23: 602–7.
- 24 Kjær MM, Madsbad S, Hougaard DM, Cohen AS, Nilas L. The impact of gastric bypass surgery on sex hormones and menstrual cycles in premenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2016; 33: 160–163.
- 25 Botella-Carretero JJ, Balsa JA, Gómez-Martin JM, Peromingo R, Huerta L, Carrasco M, et al. Circulating free testosterone in obese men after bariatric surgery increases in parallel with insulin sensitivity. *J Endocrinol Invest* 2013; 36: 227–32.
- 26 Pham NH, Bena J, Bhatt DL, Kennedy L, Schauer PR, Kashyap SR. Increased Free Testosterone Levels in Men with Uncontrolled Type 2 Diabetes Five Years After Randomization to Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2018; 28: 277–280.
- 27 Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update* 2017; 23: 371–389.
- 28 Kyröläinen H, Hackney AC, Salminen R, Repola J, Hakkinen K, Haimi J. Effects Of Combined Strength And Endurance Training On Physical Performance And Biomarkers Of Healthy Young Women. *J Strength Cond Res* 2017; 32: 1554–1561.
- 29 Kong Z, Fan X, Sun S, Song L, Shi Q, Nie J. Comparison of High-Intensity Interval Training and Moderate-to-Vigorous Continuous Training for Cardiometabolic Health and Exercise Enjoyment in Obese Young Women: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One* 2016; 11: e0158589.
- 30 Williams NI, Reed JL, Leidy HJ, Legro RS, De Souza MJ. Estrogen and progesterone exposure is reduced in response to energy deficiency in women aged 25–40 years. *Hum Reprod* 2010; 25: 2328–39.
- 31 Smith AJ, Phipps WR, Arikawa AY, O'Dougherty M, Kaufman B, Thomas W, et al. Effects of Aerobic Exercise on Premenopausal Sex Hormone Levels: Results of the WISER Study, a Randomized Clinical Trial in Healthy, Sedentary, Eumenorrheic Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1098–106.

- 32 Moghadasi M, Siavashpour S. The effect of 12 weeks of resistance training on hormones of bone formation in young sedentary women. *Eur J Appl Physiol* 2013; 113: 25–32.
- 33 Sarwer DB, Wadden TA, Spitzer JC, Mitchell JE, Lancaster K, Courcoulas A, et al. 4-Year Changes in Sex Hormones, Sexual Functioning, and Psychosocial Status in Women Who Underwent Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2018; 28: 892-899.
- 34 Shih DM, Wang Z, Lee R, Meng Y, Che N, Charundindla S, et al. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2015; 56: 22–37.
- 35 Falls JG, Ryu DY, Cao Y, Levi PE, Hodgson E. Regulation of Mouse Liver Flavin-Containing Monooxygenases 1 and 3 by Sex Steroids. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 212–223.
- 36 El-Alfy AT, Schlenk D. Effect of 17beta-estradiol and testosterone on the expression of flavin-containing monooxygenase and the toxicity of aldicarb to Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Toxicol Sci* 2002; 68: 381-8.
- 37 Coecke S, Debast G, Phillips IR, Vercruysse A, Shephard EA, Rogiers V. Hormonal regulation of microsomal flavin-containing monooxygenase activity by sex steroids and growth hormone in co-cultured adult male rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1047-51.
- 38 Mitchell SC, Smith RL. A physiological role for flavin-containing monooxygenase (FMO3) in humans? *Xenobiotica* 2010; 40: 301-305.
- 39 Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Trimethylamine and trimethylamine n-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (fmo3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. *Drug Metab Dispos* 2016; 44: 1839–50.
- 40 Tian J, Huang S, Sun S, Ding L, Zhang E, Liu Y, et al. Bile acid signaling and bariatric surgery. *Liver Research* 2017; 1; 208-213.
- 41 Camarheiro JM, Júnior JSC, Ciampo LAD, Navarro AM, Antonucci GA. Body Composition Estimatives by Anthropometry, Bioelectrical Impedance and Deuterium Oxide Dilution in Obese Adolescents. *Food Nutri Sci* 2013; 4: 9-17.
- 42 Bila WC, Freitas AE, Galdino AS, Ferrioli E, Pfrimer K, Lamounier JA Deuterium oxide dilution and body composition in overweight and obese schoolchildren aged 6---9 years. *J Pediatr* 2016; 92: 46-52.

Figures

Figure 3 - Trimethylamine-N-oxide (TMAO) and precursor plasma concentrations in obese subjects before and after physical training (PT) or bariatric surgery (BS). Fasting TMAO (A), choline (B), betaine (C), and carnitine (D) concentrations were measured. Student t or Wilcoxon test were used for group comparison: * (p<0.05), ** (p<0.01) or *** (p<0.001). Data were presented as means ± standard deviations. Black marker indicates values “before intervention”. White marker means “after intervention”. ns as non-significant.

Figure 2 – Correlations between TMAO and fat free mass (A), fat mass (B), testosterone (C) and estrone (D). Groups were merged for analysis.

Supplementary Material

Figure S1 – Correlations between Testosterone and fat free mass (A), fat mass (B), estrone (C). Groups were merged for analysis.

Figure S2 – Correlations between Estrone and fat free mass (A) and fat mass (B). Groups were merged for analysis.