UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

POTENCIAL DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA A PREVENÇÃO DO DIABETES TIPO 2 INDUZIDO POR DIETA DE CAFETERIA: PAPEL DO TECIDO ADIPOSO BRANCO.

TALITA SAYURI HIGA

São Paulo

2012

TALITA SAYURI HIGA

POTENCIAL DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA A PREVENÇÃO DO DIABETES TIPO 2 INDUZIDO POR DIETA DE CAFETERIA: PAPEL DO TECIDO ADIPOSO BRANCO.

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista

São Paulo

2012

Nome: HIGA, Talita Sayuri

Título: Potencial do treinamento físico aeróbio para a prevenção do diabetes tipo 2 induzida por dieta de cafeteria: papel do tecido adiposo branco

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Fabiana Evangelista, por acreditar no meu potencial e me ensinar a enfrentar todos os desafios com muita coragem, por despertar em mim o entusiasmo pela pesquisa através da sua paixão pela profissão. Agradeço pela dedição e muitas horas despendidas pelo meu trabalho, pelos conselhos e pela amizade construída ao longo desses anos.

À Dra. Miriam Alaniz, por fazer parte da minha formação acadêmica de maneira tão intensa, pelos inúmeros ensinamentos na bancada, discussões teóricas de corredor e conselhos, tão importantes para o meu amadurecimento profissional. Agradeço pela agradável companhia e amizade formada ao longo desses anos.

Aos meus pais, Oswaldo e Marilena, pessoas essências na minha vida, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Agradeço pelo amor, apoio e incentivo para enfrentar todos os desafios e dificuldades encontradas ao longo da minha formação acadêmica.

Aos meus irmãos, Vinicius e Miyuki, pelo amor, carinho e pela torcida para que, no final, tudo dê certo. Agradeço por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por viabilizar a execução desse projeto em seu laboratório.

Aos meus amigos de fora e dentro da área acadêmica, pelo companheirismo, amizade e incentivo.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, pelo suporte e auxilio na realização dos experimentos desse projeto.

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esportes da USP, em especial a Ilza, Márcio, Paulo e Mariana, pelo suporte, atendimento e paciência sobre questionamentos sobre prazos e documentos.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

HIGA, TS. **Potencial do treinamento físico aeróbio para a prevenção do diabetes tipo 2 induzido por dieta de cafeteria: papel do tecido adiposo branco.** 2012. X f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Evidências na literatura demonstraram que o aumento da adiposidade confere maior suscetibilidade ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, pois o tecido adiposo branco (TAB) atua na regulação da homeostasia energética e da sensibilidade à insulina através da sua atividade endócrina e de interações com reguladores neuroendócrinos. O treinamento físico aeróbio tem sido fortemente recomendado para a prevenção e tratamento do diabetes tipo 2, pois promove adaptações no metabolismo energético que contribuem diretamente para a melhora da resposta glicêmica e para o controle de peso corporal. Embora esteja claro na literatura o papel do treinamento físico contra o desenvolvimento de distúrbios no metabolismo da glicose e obesidade, uma lacuna de conhecimento ainda existe quando buscamos informações a respeito da participação metabólica do TAB na prevenção do diabetes tipo 2 através do treinamento físico aeróbio. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o efeito protetor do treinamento físico contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2 é mediado por adaptações funcionais do TAB. Para isso, foram utilizados camundongos alimentados com dieta normocalórica e de cafeteria submetidos ou não ao treinamento físico aeróbio. O treinamento físico aeróbio foi eficaz para a prevenção do diabetes tipo 2, e essa resposta foi associada à menor adiposidade corporal resultante do aumento da lipólise e da capacidade oxidativa do TAB induzido pela maior ativação via da AMPK/ACC.

Palavras-chaves: diabetes tipo 2, tecido adiposo branco, dieta de cafeteria, treinamento físico aeróbio.

ABSTRACT

HIGA, TS. **Potential of aerobic exercise for the prevention of type 2 diabetes induced by cafeteria diet: role of white adipose tissue.** 2012. X f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Evidence in the literature have shown that increased adiposity confers greater susceptibility to developing type 2 diabetes and white adipose tissue (WAT) acts in the regulation of energy homeostasis and insulin sensibility through its endocrine activity and interaction with neuroendocrine regulators. Aerobic physical training has been strongly recommended for the prevention and treatment of type 2 diabetes because it promotes adaptations in the energy metabolism that contribute directly to the improvement of glycemic metabolism and body weight control. Although it is clear in the literature the role of physical training against the development of disturbances in the glucose metabolism and obesity, the role of WAT to prevent type 2 diabetes through physical training was poorly investigated. Thus, the present study aimed to test the hypothesis that the protective effect of physical training against the development of type 2 diabetes is mediated by functional adaptations of WAT. For this, we used mice fed with control or cafeteria diet and submitted or not to aerobic physical training. The physical training was effective for the prevention of type 2 diabetes, and this response was associated with lower body fat due to increased lipolysis and oxidative capacity of WAT induced by the activation of AMPK/ACC.

Key-words: type 2 diabetes, white adipose tissue, cafeteria diet, aerobic exercise training.

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 Sinalização intracelular da insulina em tecido adiposo e músculo esquelético..... 24

FIGURA 2 Representação da atividade lipolítica (Adaptado de Dunca et al., 2005)..... 29

FIGURA 3 Representação da via clássica da lipogênese..... 30

FIGURA 4 Representação da lipogênese *de novo*..... 32

FIGURA 5 Alterações nos processos metabólicos do tecido adiposo no desenvolvimento do diabetes tipo 2..... 37

FIGURA 6 Desenho experimental do projeto..... 46

FIGURA 7 Evolução de peso corporal durante o protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15), TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *SED-CAF vs. TF-NO, #SED-CAF vs. TF-NO e TF-CAF, &SED-CAF vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 53

FIGURA 8 Peso dos depósitos gordura subcutâneo (TAB-SC), periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP) em valores absolutos (A) e corrigidos pelo peso corporal no momento da eutanásia (B). SED-CO (n=24), TF-CO (n=26), SED-CAF (n=23) e TF-CAF (n=24). Índice de adiposidade corporal (C). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤0,05 sendo, *vs. TF-CO e TF-CAF, #vs. SED-CO, TF-CO e TF-CAF..... 55

FIGURA 9 Valores médios do diâmetro de 100 adipócitos do TAB-PE (A). Imagem dos adipócitos obtida em microscópio com aumento de 10X (B). SED-NO (n=9), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=9) e TF-CAF (n=10). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 56

FIGURA 10 Média do consumo alimentar diário em gramas (A) e em quilocalorias (B) durante o protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média..... 58

FIGURA 11 Consumo de oxigênio em repouso avaliado por calorimetria indireta (A). SED-NO (n=5) TF-NO (n=5) SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=5). Temperatura corporal avaliada antes e após protocolo experimental (B). Perda de peso corporal induzida pelo jejum de 8 horas (C). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10) e TF-CAF (n=12). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8), #vs. SED-CAF..... 60

FIGURA 12 Tempo total percorrido durante teste de tolerância ao esforço físico em esteira antes e após protocolo experimental (A). SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8)..... 61

FIGURA 13 Medidas indiretas de pressão arterial média (A) e frequência cardíaca de repouso (B) avaliados antes e após protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15), TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8)..... 62

FIGURA 14 Glicemia de jejum avaliada antes e após protocolo experimental (A). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10), TF-CAF (n=13). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 8) e TF-NO (sem 8)..... 63

FIGURA 15 Curva glicêmica referente ao teste de tolerância à glicose e AUC avaliado antes (A) e após protocolo experimental (B). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10), TF-CAF (n=13Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, #vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 64

FIGURA 16 Curva glicêmica referente ao teste de tolerância à insulina e kITT avaliado após protocolo experimental. SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=8), TF-CAF (n=7). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, #vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 66

FIGURA 17 Atividade lipolítica basal e estimulada por isoproterenol avaliada através da concentração de glicerol de adipócitos isolados dos animais após protocolo experimental. SED-NO (n=9), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=9) e TF-CAF (n=9). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (isoproterenol)..... 68

FIGURA 18 Atividade enzimática da FAS no TAB-RP (A). SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=6) e TF-CAF (n=8). Atividade enzimática da G6PDH no TAB-RP (B). SED-NO (n=11), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=10) e TF-CAF (n=10). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO e TF-NO, #vs. SED-NO e SED-CAF..... 69

FIGURA 19 Atividade enzimática da citrato sintase no TAB-PE. SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=6) e TF-CAF (n=8). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 70

FIGURA 20 Expressão proteica da AMPK (A) e p-AMPK (Thr 172) (B). SED-NO (n=5), TF-NO (n=5), SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=4). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF, #vs. SED-NO e SED-CAF..... 72

FIGURA 21 Expressão proteica da ACC (A) e p-ACC (Ser 79) (B). SED-NO (n=5), TF-NO (n=5), SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=4). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF..... 74

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Divisão dos grupos experimentais.....	40
TABELA 2	Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g).....	41
TABELA 3	Ganho de peso corporal dos animais, comprimento naso-anal (CNA) e Índice de Lee.....	54
TABELA 4	Peso de tecido e órgãos.....	57
TABELA 5	Dosagens séricas.....	67

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IDF	*International Diabetes Federation*
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
ADA	*American Diabetes Association*
TAB	tecido adiposo branco
IRS 1	substrato do receptor de insulina 1
GLUT 4	transportador de glicose
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
FAS	ácido graxo sintase
CS	citrato sintase
AMPK	proteína ativada por AMP
AMP	monofosfato de adenosina
ACC	acetil-CoA carboxilase
CoA	coenzima A
IRS 1/2	substrato do receptor de insulina 1 e 2
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
PDK	proteína quinase dependente de fosfoinositídeos
Akt	proteína quinase B
TG	triglicerídeos
LHS	lipase hormônio sensível
PKA	proteína quinase A

AMP-c	AMP ciclico
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxilase
α	alfa
β	beta
γ	gama
ATP	trifosfato de adenosina
AS160	sustrato da Akt 160
CPT-1	carnitina palmitoil transferase 1
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
IL-6	interleucina 6
SOCS 3	proteína supressora da sinalização de citocinas 3
PPAR-γ	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
ATGL	lipase de triacilglicerol do adipócito
MAGL	lipase de monoacilglicerol
LPL	lipase de lipoproteina
VLDL	lipoproteina de muita baixa densidade
CD 36	cluster de diferenciação 36
FATP	proteina transportadora de AG
ACS	acil-CoA sintetase
GPAT	glicerol-3 fosfato aciltransferase
DGAT	diacilglicerol aciltransferase
ACL	ATP citrato liase

PKC	proteína quinase C
IKKβ	fator nuclear kappa beta quinase
PDX1	fator de transcrição da insulina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
VO_2	consumo de oxigênio
O_2	oxigênio
TTG	teste de tolerância à glicose
TTI	teste de tolerância à insulina
kITT	desaparecimento da glicose plásmática
RIE	radioimunoensaio
HDL-c	lipoproteina de alta densidade
LDL-c	lipoproteina de baixa densidade
UCP 1	proteínas desacopladoras 1
UCP 2	proteínas desacopladoras 2
IMC	índice de massa corporal
PGC1-α	coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR-α	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa

Unidades

%	porcentagem
mg	miligrama
dL	decilitro

g	grama
°C	grau Celsius
h	hora
kCal	quilocaloria
km	quilometro
min	minuto
mL	mililitro
kg	quilograma
U	unidade
rpm	rotação por minuto
µL	microlitro
µm	micrometro
M	mol
nmol	nanomol
mmol	milimol
µM	micromol
nm	nanometro
cm^3	centímetro cúbico
mmHg	milimetros de mercúrio
bpm	batimentos por minuto

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO..... 20

2. OBJETIVOS..... 23

2.1. Geral..... 23

2.2. Específicos..... 23

3. REVISÃO DE LITERATURA..... 24

3.1. Regulação do metabolismo de glicose..... 24

3.2. Papel do TAB no desenvolvimento do diabetes tipo 2..... 26

3.3. Regulação metabólica do TAB..... 29

3.4. Treinamento físico aeróbio e diabetes tipo 2..... 34

3.5. Modelo experimental de diabetes tipo 2..... 37

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 40

4.1. Amostra..... 40

4.2. Dietas alimentares..... 41

4.3. Protocolo de treinamento físico..... 41

4.4. Desenho experimental..... 42

4.5. Teste de esforço físico máximo..... 43

4.6. Determinação do peso corporal e consumo de ração..... 43

4.7. Avaliação do consumo de oxigênio de repouso..... 43

4.8. Avaliação da temperatura central..... 44

4.9. Avaliação da perda de peso corporal induzida pelo jejum..... 44

4.10. Avaliação da frequência cardíaca e pressão arterial de repouso..... 45

4.11. Teste de tolerância à glicose (TTG)..... 45

4.12. Teste de tolerância à insulina (TTI)..... 45

4.13. Eutanásia e coleta de tecidos e sangue..... 46

4.14. Dosagem sérica por Radioimunoensaio (RIE)..... 46

4.15. Dosagem do perfil lipídico..... 47

4.16. Avaliação da lipólise..... 47

4.17. Dosagem da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

(G6PDH) e ácido graxo sintase (FAS)..... 49

4.18. Dosagem da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS)..... 50

4.19. Quantificação da AMPK e ACC (*Western Blot*)..... 50

4.20. Análise estatística..... 51

5. RESULTADOS..... 52

5.1. Composição corporal..... 52

5.2. Fatores que contribuem para o balanço energético..... 58

5.3. Eficácia do treinamento físico..... 61

5.4. Análise hemodinâmica..... 62

5.5. Respostas do metabolismo de glicose..... 63

5.6. Dosagens séricas..... 67

5.7. Atividade lipolítica do TAB..... 68

5.8. Lipogênese *de novo* no TAB..... 69

5.9. Atividade oxidativa no TAB..... 70

5.10. Quantificação proteica da AMPK e ACC..... 71

6. DISCUSSÃO..... 75

7. CONCLUSÃO..... 83

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 84

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tem sido considerado um dos principais problemas de saúde pública em vários países do mundo. Em 2010, o número de pessoas com diabetes no mundo era de 285 milhões, e a expectativa é que em 2030 sejam 438 milhões (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, IDF 2011). No Brasil, não existem estudos comparativos recentes, entretanto, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) estima a existência de aproximadamente 11 milhões de pessoas portadoras de diabetes, representando 5,9% da população brasileira (SBD, 2011). Mais prevalente do que o diabetes tipo 1, o diabetes tipo 2 compreende cerca de 90% dos casos e, geralmente está associado à obesidade (GROSS et al., 2002).

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA, 2010), o diabetes tipo 2 é caracterizado pela deficiência da ação da insulina em resposta à hiperglicemia. Clinicamente, os critérios diagnósticos para o diabetes são valores de glicemia de jejum por pelo menos 8 horas igual ou superiorl a 126 mg/dL, glicemia 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose igual ou superior a 200 mg/dL (teste oral de tolerância à glicose), níveis de hemoglobina glicada A1C igual ou superior a 6,5%. A identificação de qualquer um dos parâmetros diagnósticos descritos confirma o diabetes tipo 2.

É sabido que o desenvolvimento de resistência à insulina e a consequente progressão para o diabetes tipo 2 está fortemente associado ao estilo de vida dos indivíduos, caracterizado pela predominância de alimentação rica em gordura saturada, açúcares simples e colesterol, e reduzido nível de atividade física (BOECKNER et al., 2006; GARBER, 2012). Prejuízos na captação de glicose em tecidos metabolicamente ativos responsivos à insulina, tais como músculo esquelético e tecido adiposo branco (TAB) são resultantes da ingestão excessiva de alimentos com alta densidade calórica (OAKES et al, 1997; SHANKAR et al., 2010). Além disso, a redução do gasto energético associada à inatividade física tem contribuído diretamente para o aumento da obesidade, que por sua vez, também favorece as modificações na homeostasia glicêmica (WILLIAMSON et al., 2009), aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (LARSON-MEYER et al., 2006; YOU et al., 2006). De fato, estudos recentes mostraram que a progressão da resistência à insulina para o diabetes tipo

2 está diretamente associada à obesidade (BAENA-DIEZ et al., 2011; SORIGUER et al., 2012).

O TAB, além de constituir o principal reservatório energético do organismo, exerce importante função fisiológica ao atuar como um órgão endócrino dinâmico envolvido em processos fisiológicos e patológicos do organismo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Além disso, o TAB é capaz de modular a homeostasia energética e tem papel importante na regulação da sensibilidade à insulina através da sua atividade endócrina e de interações com reguladores neuroendócrinos (BAYS, et al,. 2008).

Proteínas secretadas pelo TAB como a leptina e a adiponectina têm sido amplamente estudadas por interferir diretamente na homeostasia glicêmica, na sensibilidade à insulina (CUMMINGS, et al., 2011; XITA; TSATSOULIS, 2012) e na evolução do peso corporal (OSWAL; YEO, 2010). Estudos revelaram que a exposição crônica de adipócitos a altas doses de glicose provoca redução do número do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (BURÉN et al., 2003) e que, animais com deleção gênica do transportador de glicose (GLUT4) específico no TAB desenvolvem intolerância à glicose e hiperinsulinemia, mesmo com a preservação da expressão de GLUT4 no fígado e músculo esquelético (ABEL et al., 2001).

A prevenção e o tratamento do diabetes tipo 2 têm sido constantemente investigados na literatura. É sabido que o treinamento físico aeróbio promove adaptações no metabolismo energético que contribuem diretamente para a melhora da resposta glicêmica e para o controle de peso corporal (MARWICK et al., 2009). Malin e Kirwan (2012) observaram que indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos submetidos ao treinamento físico aeróbio durante 3 anos apresentaram redução do peso corporal, da glicemia de jejum e da incidência de diabetes tipo 2. Essas respostas podem ser atribuídas à melhora na sensibilidade dos receptores de insulina (KLIMCAKOVA et al., 2006), melhora da função mitocondrial e capacidade oxidativa no músculo esquelético (KELLEY et al., 2001), aumento da expressão de proteínas como GLUT4 e glicogênio sintase (KIM et al., 2004), redução da adiposidade corporal, principalmente abdominal, independente da perda de peso corporal (NASSIS et al., 2005; ROSS; BRADSHAW, 2009), e finalmente, modificações na secreção de adipocinas pelo TAB diretamente relacionadas com o controle glicêmico (ZENG et al., 2007; BENATTI et al., 2008).

Embora esteja claro na literatura o papel do treinamento físico contra o desenvolvimento de distúrbios no metabolismo da glicose e obesidade, uma lacuna de conhecimento ainda existe quando buscamos informações a respeito da participação metabólica do TAB na prevenção do diabetes tipo 2 através do treinamento físico aeróbio. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o efeito protetor do treinamento físico contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2 é mediado por adaptações funcionais do TAB.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o papel do TAB na prevenção do diabetes tipo 2 através do treinamento físico aeróbio.

2.2 Específicos

Estudar em camundongos sedentários e treinados, submetidos à dieta normocalórica e de cafeteria:

- a evolução do peso corporal, o peso dos tecidos adiposos brancos, o diâmetro de adipócitos, o peso dos músculos gastrocnêmios, plantar e sóleos, e peso dos órgãos;

- os fatores que contribuem para o balanço energético, tais como consumo alimentar 24 horas, consumo de oxigênio em repouso, perda de peso corporal induzida por jejum e temperatura central;

- a capacidade de realizar exercício físico;

- a pressão arterial e a frequência cardíaca em repouso;

- a glicemia de jejum, a tolerância à glicose intraperitoneal e a tolerância à insulina;

- a concentração sérica de insulina, leptina e adiponectina;

- perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e frações);

- a atividade lipolítica do TAB no estado basal e estimulada por isoproterenol;

- a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), ácido graxo sintase (FAS) e citrato sintase (CS) no TAB;

- a quantidade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e acetil-CoA carboxilase (ACC) no TAB.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Regulação do metabolismo de glicose

A insulina, hormônio secretado pelas células beta-pancreáticas, exerce um importante papel no armazenamento dos substratos energéticos por determinar o destino metabólico da glicose, dos ácidos graxos e dos aminoácidos (BENITO, 2011). Tanto no músculo esquelético quanto no tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose através da translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície celular. Essa cascata de sinalização envolve a ligação da insulina ao seu receptor seguida pela fosforilação/ativação dos substratos do receptor da insulina 1 e 2 (IRS1/2). A fosforilação da IRS1/2 desencadeia a ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que promove a interação entre a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos (PDK) e proteína quinase B (Akt). Essa interação desencadeia a fosforilação/ativação da Akt promovendo a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana celular (SALTIE; KAHN 2001; HUANG; CZECH 2007) (FIGURA 1).

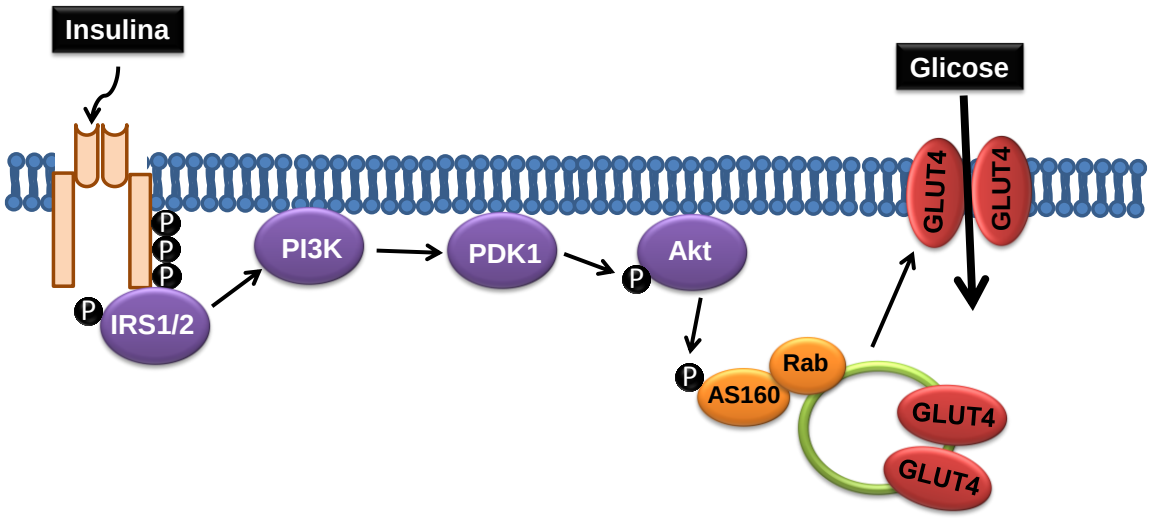


FIGURA 1 - Sinalização intracelular da insulina em tecido adiposo e músculo esquelético.

Além da captação da glicose, a insulina estimula a síntese de glicogênio e inibe a glicogenólise no músculo esquelético (DIMITRIADIS et al, 2011). No tecido adiposo, a insulina estimula a síntese de triglicerídeos (TG) através do processo denominado lipogênese *de novo* (BOGAN; KANDROR, 2010) e inibe a lipólise através da ação sobre a enzima lipase hormônio sensível (LHS), inibição da atividade da proteína quinase A (PKA), redução dos níveis de AMP-c e aumento dos níveis de malonil-CoA (DIMITRIADIS et al, 2011), assegurando que o metabolismo seja mobilizado na direção anabólica (DAVAL et al., 2007; CHOI et al., 2010). No fígado, a insulina bloqueia a gliconeogênese através da inibição da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK) e reduz a glicogenólise hepática (YANG et al., 2009).

Embora a insulina seja o principal hormônio responsável pela captação de glicose pelos tecidos metabolicamente ativos, mudanças nas vias de sinalização intracelulares independente da insulina moduladas pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também podem contribuir para essa resposta (JESSEN; GOODYEAR, 2005; O'NEILL et al., 2012). A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas (α1 e α2), e duas subunidades regulatórias (β e γ), com as seguintes isoformas (β1, β2, γ1 γ2 e γ3) (MUSI et al., 2005). Sua ativação é feita através da fosforilação do resíduo de tirosina 172 localizado na subunidade α sempre que ocorrer um decréscimo no nível energético celular determinado pelo aumento na relação AMP-ATP ou decréscimo da creatina-fosfocreatina (MUSI et al., 2005; SANDERS et al., 2007; TOWLER; HARDIE, 2007).

Quando fosforilada, a AMPK estimula a captação de glicose via fosforilação do substrato da Akt 160 (AS160) (SAKAMOTO; HOLMAN, 2008) e conseqüente translocação de GLUT4, tanto no músculo esquelético (LIM et al., 2010) quanto no tecido adiposo (WU et al., 2003; GAIDHU; CEDDIA. 2010). Além disso, a AMPK fosforila a acetil-CoA carboxilase (ACC) no resíduo serina 79, forma na qual a atividade é inibida (KAHN et al., 2005). Por catalisar a reação de formação do malonil CoA, a inativação da ACC reduz a concentração de malonil CoA, resultando em diminuição da inibição da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), uma importante proteína transportadora de ácido graxo para dentro da mitocôndria (MUNDAY, 2002; PÁDUA et al., 2009). No fígado, a AMPK participa da regulação da

gliconeogênese pela modulação das enzimas glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxilase (COOL et al., 2006).

Em síntese, a AMPK ativa vias que aumentam a síntese de ATP disponibilizando mais glicose e ácido graxo para a oxidação e inativa as vias que consomem ATP (LIM et al., 2010). Interessante observar que, tanto em animais (BRANDT et al., 2010) quanto em humanos (SRIWIJITKAMOL, et al., 2007) obesos e diabéticos, a atividade da AMPK pode estar reduzida no tecido adiposo (GAIDHU et al., 2009), no músculo esquelético (FUJII et al., 2008) e no fígado (SAMSON et al., 2011), sugerindo importante participação nos mecanismos celulares envolvidos com os prejuízos metabólicos teciduais.

3.2. Papel do TAB no desenvolvimento do diabetes tipo 2

A diminuição da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina está associada ao aumento crônico da sua secreção. Inicialmente, a redução da ação da insulina provoca menor remoção de glicose, e na tentativa de diminuir a hiperglicemia, uma maior quantidade de insulina é secretada pelo pâncreas, resultando em hiperinsulinemia (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002). A persistência do estado hiperinsulinêmico resulta na resistência à insulina, definida como a incapacidade de uma concentração exógena ou endógena de insulina aumentar a captação de glicose pelos tecidos (BENITO, 2011).

A resistência à insulina tem um papel importante no desenvolvimento do diabetes tipo 2. Um estudo demonstrou que as alterações na concentração de glicose plasmática, sensibilidade à insulina e secreção da insulina ocorrem três a seis anos previamente ao diagnóstico de diabetes (TABÁK et al., 2009). Além disso, diversos estudos na literatura demonstraram que em indivíduos e animais diabéticos há prejuízo na sinalização da insulina com redução da expressão proteica de IRS1, PI3-K e Akt (FOLLI et al., 1993; KROOK et al., 2000; YU et al., 2002).

A participação do TAB no desenvolvimento de diabetes tipo 2 tem sido amplamente estudada na literatura. Alterações na adiposidade corporal exercem implicações importantes na homeostasia glicêmica, pois quando observamos os

extremos (obesidade e lipodistrofia), ambos estão associados à resistência à insulina e hiperglicemia (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). De acordo com Blumenkrantz (1997), para aumentos de 10% na adiposidade corporal, pode-se observar aumento em 2mg/dl na glicemia de jejum. De fato, Soriguer et al. (2012) mostraram que indivíduos que tiveram maior ganho de peso corporal apresentaram maior incidência de diabetes tipo 2. Na mesma direção, Schrauwen (2007) demonstrou que o aumento da resistência à insulina no músculo esquelético de animais está diretamente relacionado ao maior ganho de peso corporal.

Nos últimos anos, pesquisas têm sido realizadas visando a compreensão dos mecanismos celulares pelos quais o TAB pode induzir resistência à insulina e diabetes tipo 2. Apesar de o TAB ser responsável pela captação de apenas 10% da glicose pós-prandial, alterações na expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina nesse tecido potencializam o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (SMITH, 2002). Algentaedt et al. (2004) observaram redução significativa na fosforilação no resíduo tirosina de IRS1 em adipócitos de indivíduos diabéticos. Na mesma direção, Burén et al. (2003) observaram redução na expressão de IRS1 e menor captação de glicose em adipócitos de ratos expostos cronicamente à glicose. Outros estudos mostraram que em adipócitos de indivíduos e animais diabéticos há redução da atividade da PI3K (SMITH et al., 1999) e da expressão do transportador GLUT4 (HUSSEY et al., 2011).

As evidências na literatura que dão suporte para a associação entre o aumento da adiposidade corporal e os distúrbios no metabolismo da glicose também estão diretamente relacionadas com a função endócrina do TAB. É sabido que as adipocinas, proteínas secretadas pelo tecido adiposo, são capazes de modular a sinalização da insulina e de fatores envolvidos no metabolismo da glicose e de lipídios. Além disso, a variação na produção das adipocinas relaciona-se diretamente com as alterações da adiposidade corporal (KERSHAW; FLIER, 2004).

Por exemplo, animais alimentados com dieta hipercalórica apresentam maior adiposidade e aumento da expressão gênica e na concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6) (LEE; SHIN; CHOUE, 2010; KIM et al., 2011). Essas citocinas podem promover resistência à insulina através da inativação do receptor de insulina via fosforilação do

resíduo serina, (HIROSUMI et al., 2002), através da indução da supressão da proteína supressora da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) (HOWARD; FLIER, 2006) e ainda, através da produção de espécies reativas de oxigênio (HOUSTIS et al., 2006).

Outras adipocinas produzidas pelo tecido adiposo também participam da regulação metabólica da glicose e lipídios. A leptina, por exemplo, influencia diretamente o balanço energético por inibir o apetite e estimular o metabolismo energético (FRIEDMAN, 2009). Além disso, aumenta a sensibilidade à insulina no TAB, no músculo esquelético e no fígado, reduzindo o conteúdo intracelular de lipídios através da ativação da AMPK e mediadores de sinalização do sistema nervoso central (ROSEN; SIPEGELMAN, 2006). Entretanto, indivíduos e animais obesos, apesar de possuírem níveis elevados de leptina sérica, apresentam redução dos efeitos da leptina em função do desenvolvimento de resistência à ação desse hormônio (OSWAL; YEO, 2010). Isso tem sido classicamente observado em animais submetidos à dieta hipercalórica, cuja expressão de proteínas envolvidas na sinalização de leptina e de insulina encontra-se prejudicadas (MORRISON et al., 2009).

A adiponectina, também secretada pelo tecido adiposo, é a única adipocina que possui secreção inversamente proporcional à adiposidade, ou seja, quanto maior a adiposidade, menor a secreção de adiponectina. Entre as principais funções, promove aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético através da ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ) e AMPK (YOON et al., 2006), aumenta a captação de glicose em adipócitos de ratos (WU et al., 2003), promove maior secreção de insulina e redução na concentração plasmática de glicose através da ativação da AMPK no músculo esquelético (YAMAGUCHI et al., 2002). Interessante observar que a redução na concentração da adiponectina está presente no diabetes tipo 2 (PUNYADEERA et al., 2005), resistência à insulina (SPRANGER et al., 2003) e doenças cardiovasculares (KUMADA et al., 2003). Por outro lado, a superexpressão de adiponectina em adipócitos 3T3-L1 promove diferenciação celular, aumento da síntese de lipídeos e melhora a sensibilidade à insulina (FU et al., 2005).

3.3. Regulação metabólica do TAB

O TAB possui intensa atividade metabólica que contribui de forma significativa para a manutenção da homeostasia energética do organismo. As principais ações metabólicas do TAB podem ser divididas em: lipólise (hidrólise de TG) e lipogênese (armazenamento de TG na gotícula de lipídio) (CINTI, 2009).

A atividade lipolítica ocorre quando há ligação das catecolaminas nos receptores beta-adrenérgicos permitindo o aumento da AMP-c e ativando a proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila a lipase hormônio sensível (LHS) nos resíduos de serina 563, 659 e 660 (ARNER, 2005; SHEN et al., 1998) e as perilipinas (SZTALRYD et al., 2003) para que possa ocorrer a hidrólise de TG. Além da LSH, a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e lipase de monoacilglicerol (MAGL) exercem papéis importantes na hidrólise de TG, na qual a ATGL também participa na fase inicial da hidrólise de TG clivando o primeiro AG e o MAGL finaliza a hidrólise clivando o último AG do diacilglicerol (ARNER, 2005; DUNCAN et al., 2007) (FIGURA 2).

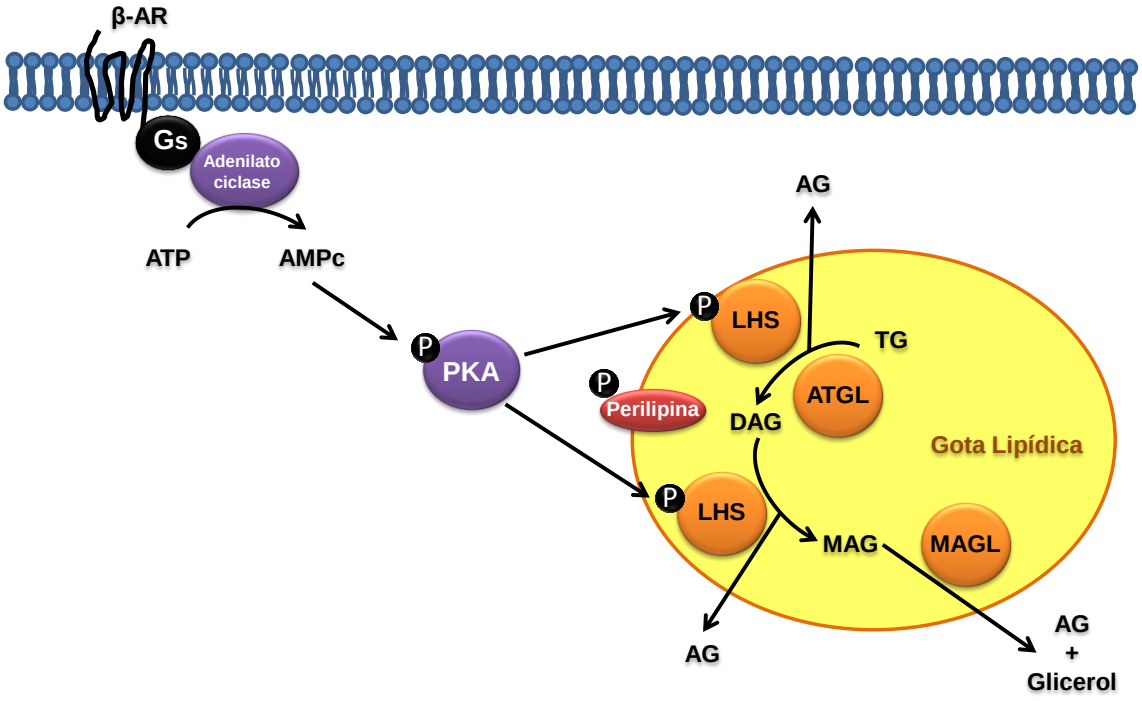


FIGURA 2 - Representação da atividade lipolítica (Adaptado de Dunca et al., 2005)

O processo lipogênico resulta na biossíntese de TG a partir da esterificação de AG complexados com coenzima A (CoA) com glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é obtido da via glicolitica e os AG são derivados de três fontes: a) proveniente das lipoproteínas através da ação da lipase de lipoproteínas (LPL) b) biossíntese a partir de Acetil-CoA fornecida pela via glicolítica (lipogênese *de novo*) c) proveniente da atividade lipolítica (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; CAWTHORN; SETHI, 2008).

A maior parte dos AG fornecidos para síntese de TG é proveniente das lipoproteínas (quilomicrons e VLDL) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006), que sofrem hidrólise pela LPL, liberando AG (WANG; ECKEL, 2009). Esse AG é transportado para o adipócito com auxílio de proteínas transportadoras como CD36 e proteína transportadora de AG (FATP) (SCHWENK et al., 2010) Uma vez dentro da célula, o AG é acilado com CoA formando acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS) (FONSECA-ALANZI et al., 2006). Finalmente, acil-CoA juntamente com glicerol-3-fosfato são esterificados em TG pela ação das enzimas glicerol-3 fosfato aciltransferase (GPAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (SHI; CHENG, 2008; TAKEUCHI et al., 2009)(FIGURA 3).

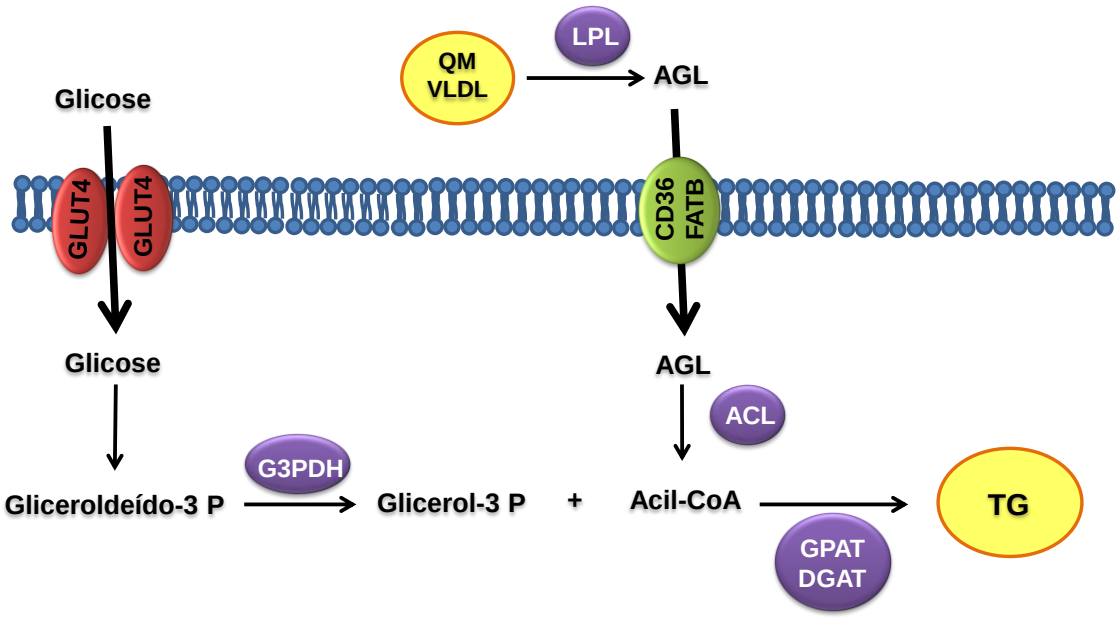


FIGURA 3 - Representação da via clássica da lipogênese

A lipogênese *de novo*, definida por processos metabólicos que resultam na biossíntese e incorporação de TG nas gotículas de gordura do adipócito a partir de substratos diferentes de lipídeos (FONSECA-ALANIZ, et al., 2006). Esse processo ocorre pela conversão da citrato em acetil-CoA pela enzima ATP citrato liase (ACL) (WAKIL; STOOPS; JOSHI, 1983). Acetil-CoA é convertida a malonil-CoA pela enzima ácido graxo carboxilase (ACC) que será utilizada como substrato para síntese de TG pela enzima ácido graxo sintase (FAS) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). (FIGURA 4).

A lipogênese *de novo* funciona como uma importante via para o aumento da adiposidade (KOVACS, et al., 2004), e tanto a expressão quanto a atividade das enzimas FAS e ACC, fundamentais para esse processo, podem estar aumentadas em indivíduos obesos e diabéticos (BERNDT et al., 2007; SHANKAR et al., 2010). No entanto, esses dados são contrapostos por outros estudos que não observaram tais respostas enzimáticas (TURNER et al., 2007; ORTEGA et al., 2010), revelando a necessidade de mais estudos para esclarecer tais respostas. Um possível mecanismo de inibição da lipogênese *de novo* seria a maior disponibilidade de ácidos graxos proveniente da dieta (quilomicrons), resultando em diminuição da atividade da citrato sintase e da via de lipogênese *de novo* no TAB (GAIDHU et al., 2010).

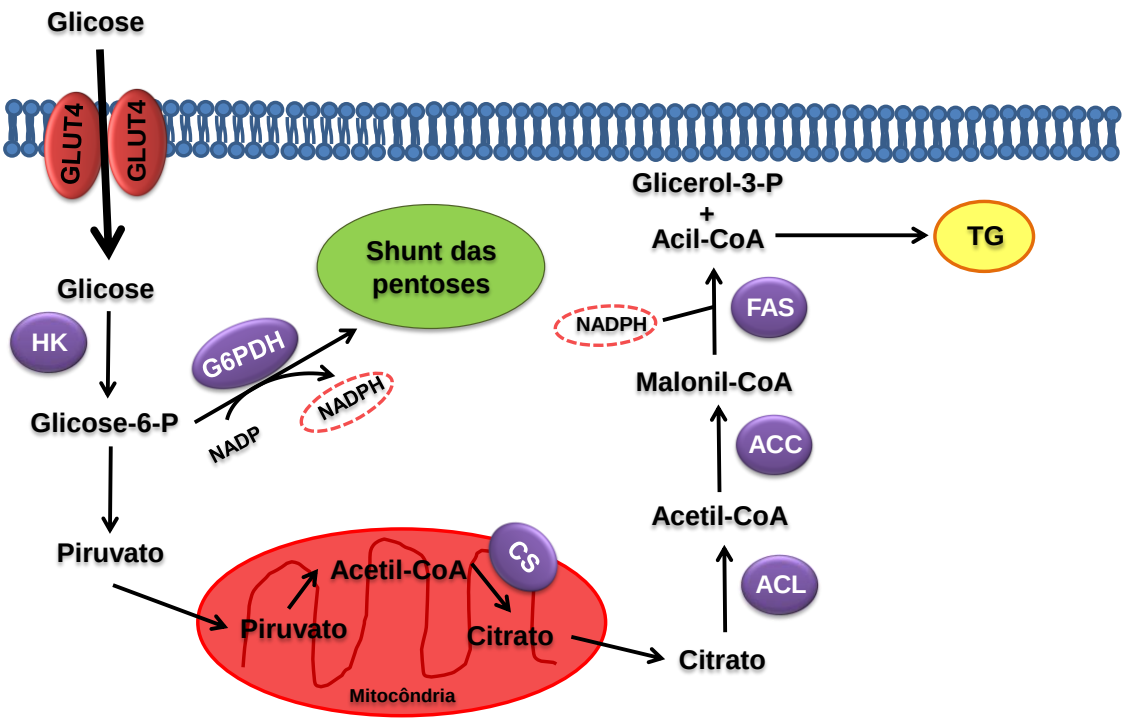


FIGURA 4 - Representação da lipogênese *de novo*

Alterações no balanço desses processos metabólicos são observadas quando há maior demanda energética, por exemplo, no exercício físico e jejum (redução da lipogênese e aumento da lipólise) (LAGIN, 2011). Outra situação interessante pode ser observada em indivíduos obesos, os quais apresentam aumento na lipogênese, redução na lipólise e oxidação de TG, ocasionando aumento da adiposidade corporal (ARNER, et al., 2011).

Considerando que a sensibilidade à insulina no TAB é influenciada pela massa e tamanho dos adipócitos (LÖNN et al., 2010), alterações no metabolismo dos adipócitos que resultem em diminuição ou aumento da massa do TAB também podem participar da regulação da homeostasia glicêmica (HUSSEY et al., 2011). Enquanto em indivíduos saudáveis, a lipólise fornece ácidos graxos para serem utilizados como substrato energético de acordo com a necessidade do organismo (LANGIN, 2006), em indivíduos e roedores obesos e diabéticos observa-se aumento crônico da lipólise e da disponibilidade de ácidos graxos na circulação (DELARUE; MAGNAN, 2007; JOCKEN; BLAAK, 2008). Esse aumento exacerbado da atividade

lipolítica pode ser evidenciado quando se observa resistência à ação da insulina no TAB, impedindo a ação antilipolítica desse hormônio (RODEN, 2004; STUMVOLL; GOLDSTEIN; HAEFTEN, 2005).

Além da insulina, a AMPK também parece exercer papel anti-lipolitico ao fosforilar a LHS no resíduo serina 565 impedindo a fosforilação pela PKA em serina 563 (GARTON et al., 1989; CEDDIA, 2012). Além disso, a fosforilação em serina 565 causa alterações estruturais da LHS, impedindo a translocação dessa enzima e, consequentemente, a fosforilação pela PKA (SU et al., 2003). De fato, o aumento da atividade da AMPK promoveu aumento da fosforilação em serina 565 e redução da fosforilação em serina 563 e 660 da LHS em adipócitos isolados de ratos em condição basal e estimulada com adrenalina (ANTHONY; GAIDHU; CEDDIA, 2009). No entanto, a ação da AMPK no TAB é bastante contraditória na literatura, especialmente quando investigada em situações de distúrbios metabólicos, tais como obesidade e diabetes tipo 2 (CEDDIA, 2012), e por isso, novas investigações ainda são necessárias.

Parte do excesso de ácidos graxos oriundos do TAB pode ser captada pelo tecido muscular, no entanto, na ausência do aumento da capacidade oxidativa, serão acumulados no tecido. Nesse caso, o excesso de lipídios intramusculares pode alterar a sinalização da insulina através da redução da habilidade da insulina para fosforilar seus receptores de membrana IRS1 e IRS2, resultando em menor captação de glicose pelo músculo esquelético (SHULMAN, 2000). Além disso, prejuízos na capacidade oxidativa do músculo esquelético aumentam a formação de metabólitos como acil-CoA, que também interferem na via de sinalização da insulina, ativam proteínas quinases como a proteína quinase C (PKC) e fator nuclear kappa beta quinase (IKKβ), os quais estão associados à ativação de TNF-α e IL-6, e participam, portanto, do desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes tipo 2 (RANDLE, 1998; DELARUE; MAGNAN, 2007).

Embora o músculo esquelético tenha capacidade de oxidar ácidos graxos muito superior comparado ao TAB, prejuízos na capacidade oxidativa do TAB em situações de excesso de ácidos graxos, podem favorecer o direcionamento para o armazenamento de ácidos graxos (lipogênese clássica), e consequentemente, aumento da adiposidade corporal. Gaidhu et al. (2010) mostraram que animais

alimentados com dieta hipercalórica apresentaram redução da AMPK e da capacidade de oxidação lipídica no TAB, facilitando o acúmulo de TG proveniente da dieta hiperlipídica. Esses dados sugerem que o acúmulo de TAB é resultante não apenas das alterações em vias lipogênicas, mas também de prejuízos na capacidade oxidativa do TAB. Nesse sentido, surge uma questão ainda não investigada na literatura é sobre a possibilidade de prevenir o diabetes tipo 2 por meio da melhora da capacidade oxidativa do TAB, mesmo quando a oferta de ácidos graxos é mantida, como no caso da ingestão de dietas hipercalóricas.

3.4. Treinamento físico aeróbio e diabetes tipo 2

Evidências na literatura apontam para a importância da aquisição de um estilo de vida saudável como método preventivo mais eficaz no combate à obesidade, intolerância à glicose e diabetes (WALKER et al., 2010; CHUDYK; PETRELLA, 2011). Nesse sentido, encorajar os indivíduos para realização de exercícios físicos regulares e adotar de hábitos alimentares saudáveis pode ser a prevenção primária mais eficaz para combater distúrbios metabólicos.

Um dos efeitos classicamente observados com o treinamento físico aeróbio é a melhora do perfil glicêmico através do aumento da sensibilidade à insulina (KLIMCAKOVA et al., 2006), aumento da expressão de receptor de insulina e de transportador de glicose GLUT4 (KIM et al., 2004) e redução dos níveis de hemoglobina glicada (UMPIERRE et al, 2011). No músculo esquelético, além da melhora na sensibilidade à insulina, o treinamento físico aeróbio melhora a função endotelial e capilarização (De FILIPPIS et al., 2006), aumenta a biogênese mitocondrial (LJBICIC et al., 2010), aumenta a quantidade de fibras do tipo 1 (DASTMALCHI et al., 2007) e aumenta a expressão e atividade de enzimas oxidativas (EVANGELISTA; KRIEGER, 2006; LEICK et al., 2009).

Vias de sinalização intracelulares independente da insulina moduladas pela ativação da AMPK também podem estar envolvidas nessas adaptações (TOWLER; HARDIE, 2007). A ativação da AMPK perifericamente é capaz de neutralizar alterações metabólicas como resistência à insulina, inflamação e deposição de lipídios em modelos animais com síndrome metabólica (LOU et al., 2005; TOWLER;

HARDIE, 2007). Pádua et al. (2009) mostraram que uma única sessão de exercício físico foi capaz de melhorar o nível glicêmico de animais diabéticos *ob/ob* e *db/db* associada ao aumento da atividade da AMPK tanto no músculo esquelético quanto no fígado desses animais. Koh, et al (2007) demonstraram que 6 semanas de treinamento físico aumentaram a atividade da AMPK em adipócitos isolados de ratos.

O treinamento físico aeróbico tem sido constantemente recomendado para o controle de peso corporal, prevenção e tratamento não farmacológico da obesidade, especialmente por promover aumento do gasto energético e, conseqüentemente, interferir diretamente no balanço energético (IRVING et al., 2008; HUNTER et al., 2010). Quando realizado em intensidade e duração adequadas, favorece o uso de ácido graxo como fonte de energia predominante (LIMA-SILVA, 2006), reduz a adiposidade (GOLLISH et al., 2009; XU et al., 2011), possibilitando aos indivíduos treinados menor peso corporal quando comparados com indivíduos não treinados (HOWARTH et al., 2006). De fato, de acordo com o *American College of Sports Medicine* (2009) caminhadas de 1 hora por dia estão associadas a 24% de redução da obesidade e 34% do diabetes do tipo 2.

A importância fisiológica do treinamento físico na modulação funcional do tecido adiposo e um possível efeito protetor contra o desenvolvimento de distúrbios metabólicos está diretamente relacionado aos processos fisiológicos determinantes da quantidade de massa adiposa, tais como lipólise e lipogênese. Dados obtidos por De Glizesinski et al. (2009) mostraram que o treinamento físico aeróbio aumenta a taxa de lipólise e reduz o peso corporal. Mais interessante ainda que, esse tipo de treinamento exerce efeito sobre a atividade enzimática oxidativa (LEICK et al., 2009; EVANGELISTA; KRIEGER, 2006), proteínas transportadoras de TG e ácidos graxos (LIMA-SILVA, 2006), densidade mitocondrial, capilarização, favorecendo diretamente a oxidação de lipídios como fonte de energia. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio crônico inibe a lipogênese *de novo* no TAB (FIEBIG et al., 2002; PETRIDOU et al., 2007). Embora a literatura tenha reportado claramente o efeito do treinamento físico sobre a lipólise e lipogênese e a melhora da oxidação músculo esquelético, pouco se sabe sobre essas respostas quando há associação de dieta cafeteria e treinamento físico concomitantemente, e possíveis consequências para a resposta glicêmica.

Por modular a massa adiposa, o treinamento físico aeróbio também influencia a função endócrina do tecido adiposo, e consequentemente, contribui para a melhora da homeostasia glicêmica. Estudos demonstram aumento da concentração de adiponectina associado ao treinamento físico crônico e consequente melhora da tolerância à glicose (KRAEMER; CASTRACANE, 2007; BOUASSIDA et al., 2008). Entretanto, o efeito do treinamento físico sobre a concentração de leptina ainda é controverso, pois alguns observaram redução dos níveis de leptina após o treinamento físico (BENATTI et al., 2008; BALDUCCI et al., 2009) enquanto outros não (LOWNDES et al., 2008; BOUASSIDA et al., 2008; HIGA et al., 2012). Além disso, um estudo realizado recentemente demonstrou que o treinamento físico produziu efeito antiinflamatório independente da perda de peso corporal, reduzindo as concentrações plasmáticas de fatores inflamatórios (BALDUCCI et al., 2009).

Dessa forma, as evidências na literatura confirmam que o excesso de substratos energéticos provenientes da dieta aumenta o processo de síntese de TG no tecido adiposo, resultando em aumento na adiposidade corporal, e consequentemente, na produção de adipocinas. Tais adipocinas podem favorecer o desenvolvimento de resistência à ação da insulina, e no TAB, esse efeito contribuirá para aumentar a atividade lipolítica. O excesso de ácido graxo proveniente da lipólise e da dieta será direcionado para o armazenamento em tecidos como o músculo-esquelético e fígado, além do TAB, em função da reduzida capacidade oxidativa desses tecidos. Esse ciclo pode ficar constantemente acionado, de forma que a cooperação metabólica entre os tecidos contribuirá para o desenvolvimento e progressão do diabetes tipo 2.

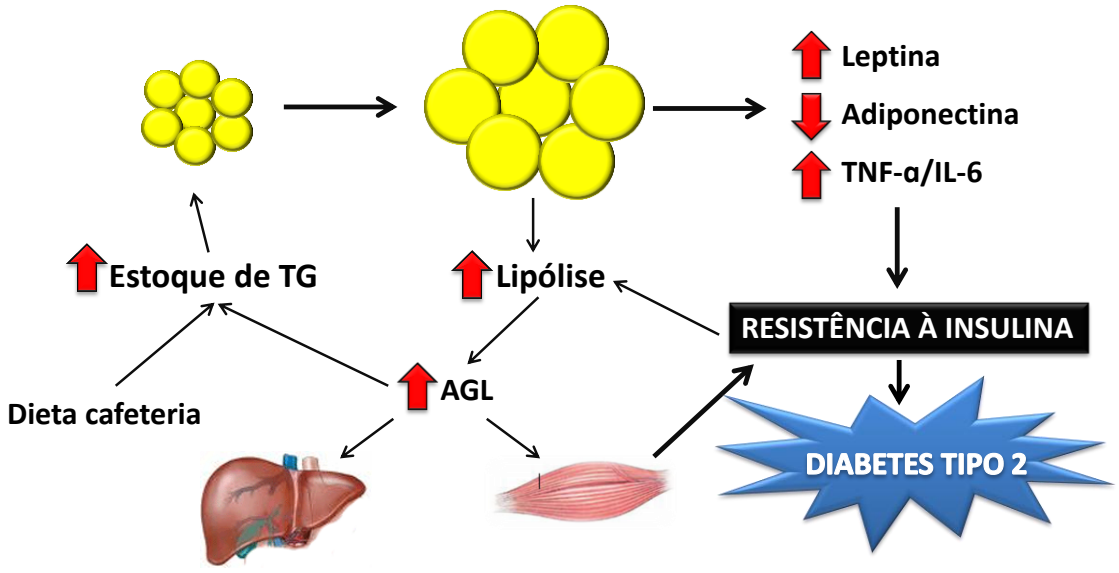


FIGURA 5 - Alterações nos processos metabólicos do tecido adiposo no desenvolvimento do diabetes tipo 2.

Considerando que o treinamento físico exerce importante influência no controle de peso corporal e adiposidade, que é capaz de induzir alterações funcionais do TAB, e ambas as respostas estão associadas à melhora da homeostasia glicêmica, estudar o efeito do treinamento físico sobre a função metabólica do tecido adiposo poderá contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos protetores acionados pelo treinamento físico contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2.

3.5. Modelo experimental de diabetes tipo 2

O aumento da prevalência de portadores de diabetes tipo 2 e as complicações cardiovasculares associadas, ampliaram a demanda pela compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento do diabetes até o desfecho clínico final. Para isso, têm sido criados modelos experimentais capazes de transpor fenótipos observados em indivíduos diabéticos, que além de permitir a investigação dos mecanismos fisiopatológicos,

têm contribuído diretamente para o desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento dessa patologia (CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

Segundo Islam e Loots (2009), existem duas categorias de modelos animais com diabetes tipo 2: 1) diabetes espontâneo por alterações genéticas; e 2) diabetes induzido experimentalmente. Na primeira categoria, podemos citar como exemplo, os animais *ob/ob e db/db,* os quais possuem mutações no gene codificante da leptina ou de seu receptor (FRIEDMAN, 2011). Além disso, com os avanços da Biologia Molecular, foram desenvolvidos diversos animais transgênicos e com deleção de proteínas-chaves do metabolismo glicêmico, tais como dos receptores de insulina (KIDO et al., 2000) e do GLUT4 (CARVALHO et al., 2005). Embora esses modelos sejam importantes para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes, essas alterações genéticas não são representativas na população em geral.

Outra maneira de estudar distúrbios metabólicos é através da indução por drogas ou manipulações dietéticas através da ração (ISLAM; LOOTS, 2009). A dieta hipercalórica consiste em uma simples troca do valor energético proveniente do carboidrato pela gordura variando entre 45 a 60% do valor energético total (WILSON et al., 2007; SAMPEY et al., 2011). A administração dessa dieta tem sido utilizada para desenvolver obesidade (KANASAKI; KOYA, 2011) e diabetes tipo 2 (ISLAM; LOOTS 2009) em animais. Dentre as linhagens de camundongo, os animais C57BL/6 são os mais utilizados para indução desses distúrbios metabólicos, pois quando alimentados com dieta hipercalórica, apresentam alterações semelhantes às da Síndrome Metabólica em humanos, tais como aumento da adiposidade corporal, intolerância à glicose e hiperglicemia (COLLINS et al., 2004).

Outro tipo de dieta hipercalórica bastante utilizada é de cafeteria, a qual é composta por alimentos com alta densidade calórica, tais como chocolate, bolacha, amendoim, responsável por induzir rapidamente alterações na adiposidade e no metabolismo glicêmico (HEYNE et al., 2009). Por ter elevada palatabilidade, induz a hiperfagia através da estimulação da alimentação hedônica (alimentação por prazer), promovendo rápido ganho de peso corporal, adiposidade corporal e resistência à insulina (HEYNE et al., 2009; PANDIT et al., 2012). De fato, Sampey et al. (2011) demonstraram que a dieta de cafeteria é um modelo mais eficazes para o

desenvolvimento de alterações no metabolismo glicêmico e morfológicas do tecido adiposo e fígado. No mesmo sentido, Castell-Auví et al. (2012) mostraram que a dieta de cafeteria promove alterações no pâncreas de ratos como aumento da deposição de lipídios, aumento no fator de transcrição da insulina (PDX1) e aumento na expressão de proteínas apoptóticas que levam ao desenvolvimento do diabetes tipo 2.

A indução de distúrbios metabólicos através da dieta de cafeteria pode ocorrer mais pelos tipos de substratos energéticos do que pelo próprio valor energético final (quilocalorias). Assim como em humanos, além do conteúdo de carboidratos, o índice glicêmico da dieta parece ser importante para o desenvolvimento de doenças metabólicas. De fato, alguns estudos mostram que uma dieta com alto índice glicêmico é mais eficaz no desenvolvimento da resistência à insulina em modelos experimentais (PAWLAK et al., 2004; SCRIBNER et al., 2008; VAN SCHOTHORST et al., 2009; ANDERSSON et al., 2010; ISKEN et al., 2010).

Sendo assim, no presente estudo, utilizaremos um modelo experimental no qual o diabetes tipo 2 é induzido através da administração de dieta de cafeteria composta por alimentos com alta densidade calórica. Para isso, nosso grupo avaliou previamente o curso temporal do desenvolvimento de diabetes tipo 2 em camundongos alimentados com a mesma dieta de cafeteria, e na ocasião, observamos que seis semanas da dieta resultou em hiperglicemia de jejum, intolerância à glicose e resistência à insulina (SPINOLA et al., 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

Para a realização do presente projeto de pesquisa foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de vida (18-22 g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: dieta normcalórica sedentário (SED-NO), dieta normocalórica treinado (TF-NO), dieta cafeteria sedentário (SED-CAF) e dieta de cafeteria treinado (TF-CAF) (TABELA 1). Todos os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente controlada entre 22 e 24°C e ciclo claro-escuro invertido 12:12h, com início da fase escura às 7:00 e início da fase clara às 19:00. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

O presente projeto está de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da USP, protocolo número 2010/13.

TABELA 1 – Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Dieta normocalórica	Dieta cafeteria
Sedentário	SED-NO (n=15)	SED-CAF (n=15)
Treinado	TF-NO (n=18)	TF-CAF (n=18)

4.2. Dietas alimentares

A composição nutricional das dietas utilizadas na pesquisa está descrita na TABELA 2. A ração de cafeteria foi adaptada de Estadella et al. (2001) e preparada com 10g de chocolate ao leite derretido, 15g da ração convencional triturada, 10g de amendoim torrado triturado, 5g de bolacha de maisena triturada e 5g de açúcar refinado (SPINOLA et al, 2010). Já a ração normocalórica utilizada foi a industrializada padrão (Nuvilab®, Paraná, Brasil).

TABELA 2 - Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g).

Dietas	Carboidrato	Proteínas	Gorduras Totais	Fibra Alimentar	Kcal/g
Normocalórica	55%	22%	4%	6%	3,78
Cafeteria	55,6%	14,77%	18,74%	3,24%	4,23

4.3. Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento físico foi realizado em esteira rolante, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. As sessões de treinamento tiveram intensidade de 60% da velocidade máxima (mensurada durante o teste de esforço físico máximo). A duração foi progressivamente aumentada, iniciando com 30 minutos na primeira semana e atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito por Ferreira et al. (2007). Essa duração de treinamento foi mantida até o término do protocolo. Os camundongos sedentários foram submetidos à caminhada na esteira, 3 vezes por semana, durante 5 minutos. Esse procedimento se fez necessário para evitar qualquer interferência do estresse gerado pela esteira.

4.4. Desenho experimental

Antes do início do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos às análises *in vivo* (peso corporal, teste de esforço físico máximo, medida de pressão arterial e frequência cardíaca de repouso, temperatura central e teste de tolerância à glicose). Em seguida, o treinamento físico e a administração da dieta de cafeteria foram iniciados simultaneamente. Na quarta semana do protocolo experimental, os grupos treinados (TF-CO e TF-CAF) foram submetidos novamente ao teste de esforço físico máximo para ajuste da intensidade do treinamento físico. Ao longo do protocolo experimental o consumo de ração e peso corporal foram avaliados semanalmente. No final da oitava semana do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos às análises *in vivo* (esforço físico máximo, medida de pressão arterial e frequência cardíaca de repouso, temperatura central, consumo de oxigênio em repouso, perda de peso corporal induzida pelo jejum, teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina). Quarenta e oito horas após a ultima sessão de exercício, das quais 8 horas finais em jejum, os animais foram anestesiados por injeção i.p. de Pentobarbital Sódico (4 mg/ 100 g de peso corporal), para posterior coleta de sangue e tecidos destinados para os procedimentos *in vitro* (lipólise, atividades enzimáticas, *western blot* e dosagens séricas),como ilustrado na FIGURA 6.

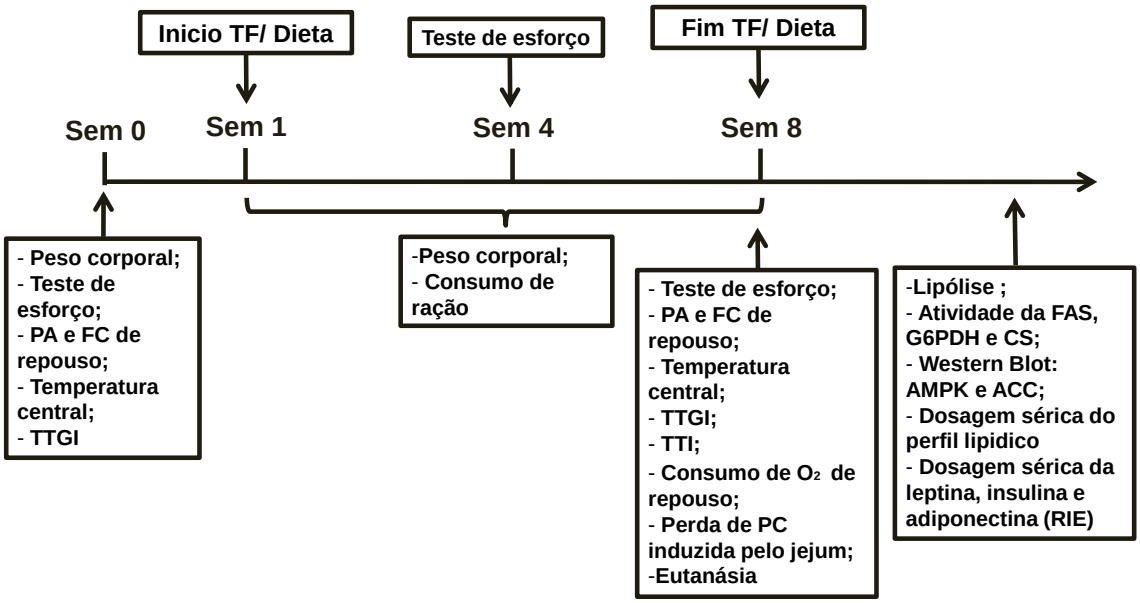


FIGURA 6 – Desenho experimental do projeto

4.5. Teste de esforço físico máximo

A capacidade de execução de exercício físico foi avaliada antes, na semana 4 e após o treinamento físico através de um teste progressivo escalonado, sem inclinação até a exaustão em esteira rolante (FERREIRA et al., 2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade da esteira foi aumentada em 0,2 km/h até atingir a exaustão do animal, a qual foi caracterizada pela impossibilidade de manutenção do padrão da corrida. A variável quantificada foi o tempo máximo de execução (min). Na semana 4, foi realizado o teste somente nos grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) para reajuste da intensidade do treinamento físico.

Durante a semana que antecedeu a execução do teste máximo, todos os animais passaram por um período de adaptação à esteira que consistiu em caminhada (0,2 a 0,4 km/h) durante 5 minutos por dia, durante 4 dias.

4.6. Determinação do peso corporal e do consumo de ração

Ao longo de todo protocolo experimental, a pesagem corporal foi realizada semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil), no mesmo dia e horário. Além da evolução do peso corporal, foi calculado o ganho de peso corporal através da diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana 0). O consumo de ração foi avaliado em grupos de animais mantidos na mesma gaiola ao longo de todo protocolo experimental (4 a 5 animais por caixa), durante períodos de 24 horas, por 3 dias consecutivos de cada semana. Utilizamos a média dos 3 dias avaliados para determinar o consumo de ração semanal.

4.7. Avaliação do consumo de oxigênio de repouso

A taxa metabólica de repouso dos animais foi determinada através da avaliação do consumo de oxigênio por calorimetria indireta após o término do

período de treinamento físico. Os animais foram avaliados após jejum de 6 horas, durante 40 minutos na caixa metabólica, sendo que o consumo de oxigênio de repouso foi considerado o menor valor de consumo de oxigênio registrado nos tempos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos. Para o cálculo de consumo de oxigênio, foi utilizada a seguinte fórmula:

VO_2 = (Pamb O_2 - Presp O_2) x 1.300 / 100/ peso corporal, onde:

Pamb O_2 = pressão de oxigênio ambiente (% de O_2)

Presp O_2 = fração expirada de oxigênio (% de O_2)

1.300 = fluxo de ar na bomba (mL/min)

Previamente à avaliação do consumo de oxigênio de repouso, os animais foram adaptados no sistema de calorimetria indireta por 5 minutos, durante 3 dias.

4.8. Avaliação da temperatura central

A temperatura corporal foi mensurada antes e após o período de treinamento físico através de um termômetro digital inserido no reto do animal. Para isso, na semana que antecedeu a avaliação, foi realizado um período de adaptação dos animais durante 3 dias. No dia da avaliação, os animais foram submetidos ao jejum de 4 horas e isolados em uma sala com temperatura ambiente controlada (22 a 25°C). A temperatura central foi mensurada 2 vezes em cada animal, à partir das quais obteve-se o valor médio de temperatura.

4.9. Avaliação da perda de peso induzida pelo jejum

O peso corporal dos animais foi avaliado antes e após o período de 8 horas de jejum que antecedeu a eutanásia. Este tipo de avaliação oferece uma simples

aproximação do gasto energético em função da eliminação da ingestão calórica (HARADA et al., 2003).

4.10. Avaliação da frequência cardíaca e pressão arterial de repouso

A frequência cardíaca e a pressão arterial (sistólica e diastólica) de repouso foram mensuradas antes e após o período de treinamento físico através de pletismografia de cauda, usando o equipamento BP-2000 Blood Pressure Analysis System™ (Visitech Systems, Carolina do Norte, USA). Antes das mensurações propriamente ditas, os camundongos passaram por um período de adaptação de 3 dias. A temperatura da plataforma foi mantida em 37°C para todos os animais. Foram realizados 10 registros para cada variável, sendo que o valor final foi obtido a partir da média dos registros.

4.11. Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTG) foi avaliado antes e após treinamento físico. Para a determinação da curva glicêmica, os animais receberam uma dose intraperitoneal de glicose (2 g/kg de peso corporal) após jejum de 8h. A glicemia foi determinada através de glicosímetro (AccuChek Advantage Roche Diagnostics®) em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose.

4.12. Teste de tolerância à insulina (TTI)

Após o período de treinamento físico, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI). Para isso, a curva glicêmica foi avaliada após a administração intraperitoneal (0,75 U/kg de peso corporal) de insulina (Novo Nordisk®, Paraná, Brasil) nos animais após jejum de 8 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0, 5, 10, 15, 20,

25, 30 e 40 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 e 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (K_{ITT}), mediante análise da curva de decaimento, de acordo com o método proposto por Bonora et al. (1989).

4.13. Eutanásia e coleta de tecidos e sangue

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento físico, das quais 8 horas em jejum, os animais foram anestesiados por injeção i.p. de Pentobarbital Sódico (4 mg/ 100 g de peso corporal). Em seguida, os animais foram pesados em balança digital, e posicionados sob uma régua para a medida do comprimento naso-anal que foi usado para a determinação do Índice de Lee através da fórmula: $\sqrt[3]{(\text{peso corporal/comprimento naso-anal})}$ (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). No momento em que o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, coletou-se o sangue através de punção na veia cava inferior. Além disso, foram coletados e pesados os depósitos de gordura branca visceral (tecido adiposo subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal), os músculos esqueléticos das patas (gastrocnêmios, plantar e sóleos) e os órgãos (coração, pulmão, rins, fígado e baço). Os pesos dos tecidos foram corrigidos pelo peso corporal no momento da eutanásia e os resultados apresentados como miligramas por grama de peso corporal (mg/g).

O sangue foi centrifugado a 4°C, 12000 rpm por 10 minutos, e o plasma armazenado em freezer a –80°C para posterior análises.

4.14. Dosagem sérica por Radioimunoensaio (RIE)

As concentrações séricas de insulina (Merck Millipore Corp., EUA), leptina (Linco Research, EUA) e adiponectina (Merck Millipore Corp., EUA) foram avaliadas através de kits comercias por radioimunoensaio.

4.15. Dosagem do perfil lipídico sérico

As concentrações séricas de TG, colesterol total e HDL-c foram avaliadas através de ensaio enzimático colorimétrico utilizando kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). As concentrações de VLD-c e LDL-c foram calculados através da equação de Friedewald (1972), onde:

VLDL-c = TG/5

LDL-c = Colesterol total – (HDL-c + VLDL-c)

4.16. Avaliação da lipólise

Os adipócitos foram isolados do tecido adiposo periepididimal mediante a técnica de digestão de tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, o depósito adiposo periepididimal foi retirado, picado com tesoura em finos fragmentos e incubado em 4,0 mL de tampão digestivo [DMEM, HEPES 25 mM, BSA 4 %, colagenase tipo II (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) 1,25 mg/mL, pH 7,45] por cerca de 30 min a 37°C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1 %, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37 ºC. Após a segunda lavagem, a suspensão celular em 25 mL de tampão EHB foi deixada 30 min em repouso em estufa a 37°C, com a finalidade de atenuar os efeitos da insulina e de outros hormônios endógenos. Para a determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), 40 µL da suspensão celular em tampão EHB foram colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (2000 rpm por 1 min). O volume total da suspensão corresponde a 100 % e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação, nos fornece o lipócrito da amostra.

Para a análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico com o programa Leica Quantimet 500. Em cada preparação foram medidas 100 células. A partir do diâmetro celular médio e admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células foi calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{(a) } V = [(\pi/6) \times D^3]/1000, \quad \text{(b) } N = (\text{lipócrito} \times 10^7)/V$$

Onde:

D é o diâmetro médio de 50 adipócitos (μm), N é o número de células e V é o volume médio (DI GIROLAMO; MENDLINGER; FERTIG, 1971). A divisão por 1000 em (a) visa expressar o volume em picolitros (pL).

As taxas de lipólise basal e estimulada pelo agonista β-adrenérgico isoproterenol (Sigma®) foram mensuradas em adipócitos isolados do tecido adiposo periepididimal conforme o seguinte protocolo: 40 μL de suspensão celular (em tampão EHB) foram transferidos para microtubos (1,5 mL) e incubados durante 30 min a 37 °C em presença de 10 μL de adenosina (ADO, Sigma, 1ug/mL em EHB, pH 7,45). Em seguida, as células foram incubados durante 30 min a 37°C em presença de 20μL adenosina deaminase (ADA, Sigma, 0,2 U/mL em tampão EHB, pH 7,45) para permitir a degradação da adenosina, um metabólito com ação anti-lipolítica, liberada no meio pelos adipócitos (HONNOR; DHILLON; LONDOS, 1985). Após este período, as células foram incubadas por 60 min a 37 °C com ou sem 10 μL de isoproterenol (10^{-5} M) totalizando um volume de 200 μL.

Ao final da incubação, a mistura de reação foi bloqueada pela transferência dos tubos para o gelo seguido por centrifugação a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, para separar as células do meio de reação. Após a centrifugação, alíquotas de aproximadamente 120 μL do meio de incubação foram retiradas e armazenadas em freezer a –20 °C para posterior mensuração do glicerol nele contido. A quantidade de glicerol liberada pelos adipócitos para o meio de incubação foi determinada pelo

método enzimático-colorimétrico (Sigma®). Os resultados foram expressos em $nmol.10^{-6}$ $cels.h^{-1}$.

4.17. Dosagem da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e ácido graxo sintase (FAS)

Para a dosagem das enzimas G6PDH e FAS, aproximadamente 100mg do tecido adiposo retroperitoneal foram suspensas em tampão de extração (na proporção de 1:3 peso/volume) contendo sacarose (250 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), leupeptina (50 μM) e aprotinina (5 μM) pH=7.4. O material mantido em gelo foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucene, Suíça) por 10 segundos em velocidade máxima, centrifugado (15000 rpm, 15 minutos, 0^0C em Centrífuga 5417 C/R- Eppendorf) para separação dos restos celulares e lipídicos.

Para a atividade da G6PDH, um volume de 15 µL do infranadante da última centrifugação foi utilizado para a determinação indireta da atividade enzimática da G6PDH, como medida da produção total de NADPH pela via das pentoses-fosfato (BERGMEYER; BENT, 1974). O tampão de ensaio utilizado (volume de 270 µL por cubeta) consistiu de Tris-HCl (8,6 mM), $MgCl_26H_2O$ (6,9 mM), NADP (0,4 mM) e Triton X-100 (0,05 %, v/v), pH 7,6. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL de glicose-6-fosfato (1,2 mM) ao extrato enzimático e acompanhada por 10 min a 25 °C. A absorbância será monitorada a 340 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 6,22.

Para a atividade da FAS, um volume de 20 µL do infranadante da última centrifugação foi utilizado para a análise indireta da atividade enzimática da FAS, como medida da oxidação (consumo) total de NADPH (BAZIN; FERRE, 2001). O tampão de ensaio utilizado (volume de 270 μL) consistiu de KH_2PO_4 (100 mM), acetilCoA (100 μM) e NADPH (200 μM), pH=6.5. A reação foi iniciada com a adição de 15 μL de malonilCoA (600 μM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 5 minutos (37 °C). A absorbância foi monitorada a 340 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 6,22.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína presente no extrato.

4.18. Dosagem da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS)

Para a dosagem da enzima citrato sintase, aproximadamente 100mg do tecido adiposo periepididimal foram suspensas em tampão de extração (na proporção de 1:3 peso/volume) contendo Tris-base (50mM) e EDTA (1mM), pH=7,4. O material mantido em gelo foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucene, Suíça) por 10 segundos em velocidade máxima, centrifugado (3000 rpm, 15 minutos, 4^0C em Centrífuga 5417 C/R- Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi retirado para a dosagem da atividade da enzima citrato sintase, através de ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro, segundo método descrito por Alp et al. (1976). A atividade foi medida a partir da quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) liberada com o DTNB do meio e oxaloacetato. O tampão utilizado no ensaio consistiu em Tris-aminometano (50 mM), EDTA (1 mM) e DTNB (0,2 mM), pH=8,1. Acetil CoA (0,1 mM) foi preparada através da adição de 1mg de Acetil CoA, 1 ml de água deionizada, 25 µl de K_2HCO_3 e uma gota de anidrido acético. Após 10 minutos de descanso no gelo, 1 ml de Acetil CoA foi misturado com 1 ml de Triton X-100 0,05% (v/v) e 10 ml de tampão de ensaio, constituindo a mistura de ensaio. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL de ácido oxaloacético (0,5mM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 20 minutos (37 °C). A absorbância foi monitorada a 412nm.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína presente no extrato

4.19. Quantificação da AMPK e ACC (*Western blot*)

Amostras do tecido adiposo periepididimal foram pesadas e conservadas em nitrogênio líquido para a quantificação das proteínas AMPK e ACC totais e fosforiladas. Para este ensaio, as amostras (200mg) foram homogeneizadas em

tampão na proporção 0,6mL para cada 200mg de tecido adiposo. O tecido adiposo foi homogeneizado em tampão contendo 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1mM EDTA (pH 8), 10% glicerol, 20mM Fluoreto de sódio, 30mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio, 50µM leupeptina e 50µM aprotinina. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 4°C. Depois, centrifugadas a 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração de proteína (utilizando o método de Bradford) e parte foi armazenada a -80°C para posteriores análises por *Western Blot*.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-AMPKα, anti-Phospho-AMPKα (Thr172), anti-ACC e anti-Phospho-ACC (Ser 79) (*Cell Signaling Technology,* Massachusetts, USA). Além disso, utilizamos anticorpo secundário goat anti-rabbit marcado com HRP (Invitrogen, New York, USA)(1:3000 em solução de leite desnatado a 5%), e como normalizador utilizaremos anticorpo para beta-actina (Abcam, Cambridge, USA). O sinal na membrana foi detectado através da reação da peroxidase na solução de ECL durante exposição no equipamento Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare Lifescience®). A intensidade das bandas foi quantificada no programa Image J (versão 1.43 para Windows).

4.20. Análise Estatística

Os dados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da média. A comparação foi feita através de análise de variância (ANOVA) de dois fatores. Na presença de diferença estatística significante, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p<0,05$). Foi utilizado o programa estatístico Statistica versão 7.

5. RESULTADOS

5.1. Composição corporal

Conforme mostra a FIGURA 7, não houve diferença estatística no peso corporal inicial entre os grupos (SED-NO= 21,3±0,6 g; TF-NO= 21,13±0,5 g; SED-CAF= 21,46±0,6 g; TF-CAF= 21,15±0,4 g). Entretanto, o peso corporal do TF-NO foi menor comparado ao peso corporal do SED-CAF a partir da semana 3. A partir da semana 5, o grupo TF-CAF também apresentou menor peso corporal em relação ao SED-CAF. Ao término do protocolo experimental, o peso corporal final do SED-CAF foi maior que o peso final dos demais grupos (FIGURA 7). Ainda, demonstramos que não houve diferença estatística no peso corporal final dos grupos TF-NO e TF-CAF comparado aos respectivos pesos corporais iniciais (TF-NO= 23,4±0,5 g vs. 24,4±0,5 g; TF-CAF= 23,3±0,5 g vs. 25,00±0,5 g), mostrando que o treinamento físico foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal mesmo durante a ingestão de dieta de cafeteria (FIGURA 7).

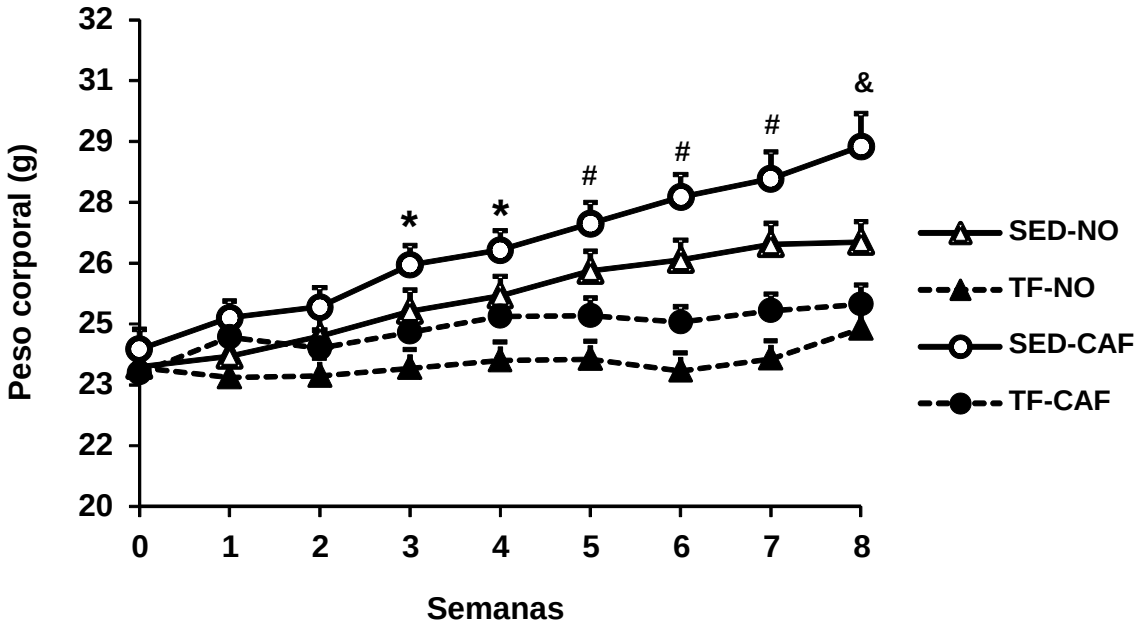


FIGURA 7- Evolução de peso corporal durante o protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15), TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *SED-CAF vs. TF-NO, #SED-CAF vs. TF-NO e TF-CAF, &SED-CAF vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

Além disso, o grupo SED-CAF apresentou maior ganho de peso corporal comparado aos grupos SED-NO, TF-NO e TF-CAF (TABELA 3). O treinamento físico, independente da dieta, reduziu o ganho de peso corporal (TF-CO e TF-CAF vs. SED-CO e SED-CAF) (TABELA 3). Não houve diferença estatística no comprimento naso-anal entre os grupos (TABELA 3). Ainda, o grupo SED-CAF apresentou maior Índice de Lee comparado ao grupo TF-CO (TABELA 3).

TABELA 3 - Ganho de peso corporal dos animais, comprimento naso-anal (CNA) e Índice de Lee.

	SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
Ganho de PC (g)	3,1±0,3	1,0±0,2#	5,0±0,8*	1,9±0,5#
CNA (cm)	9,6±0,1	9,5±0,1	9,8±0,1	9,5±0,1
Índice de Lee (g/cm³)	30,6±0,2	30,1±0,1	31,1±0,3&	30,5±0,3

Ganho de peso corporal, comprimento naso-anal e índice de Lee dos animais no momento da eutanásia. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF, #vs. SED-NO e SED-CAF e &vs. TF-NO.

Conforme demonstrado nas FIGURAS 8A e 8B, os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menores pesos dos depósitos de gordura subcutâneo (TAB-SC) em relação ao grupo SED-CAF. Já em relação ao peso dos depósitos de gordura periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP), o grupo SED-CAF apresentou maior peso quando comparado com os demais grupos, tanto em valores absolutos quanto corrigidos pelo peso corporal do animal. Ainda, quando calculamos o Índice de adiposidade corporal os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menores valores comparados com o grupo SED-CAF (FIGURA 8C).

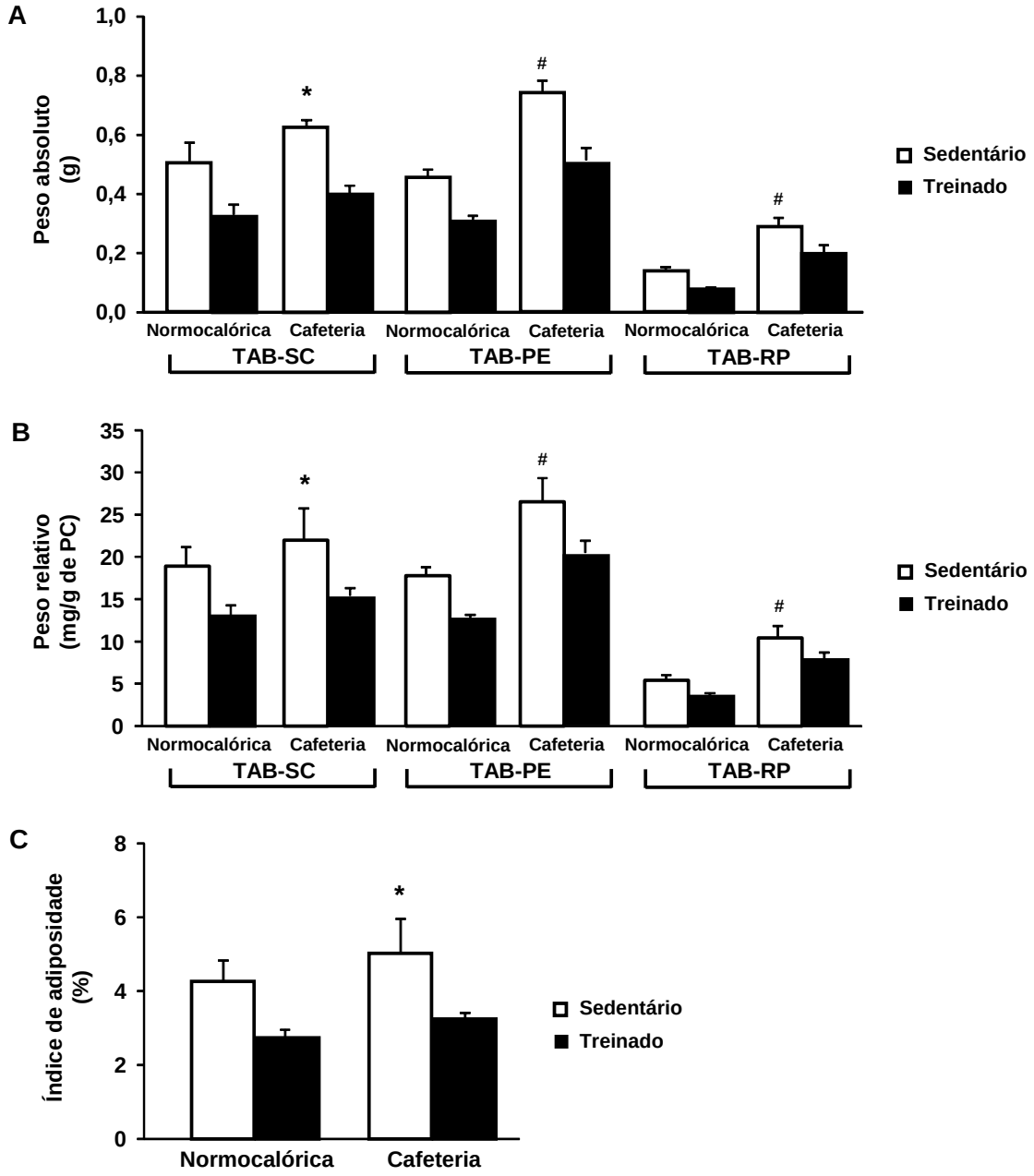


FIGURA 8 - Peso dos depósitos gordura subcutâneo (TAB-SC), periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP) em valores absolutos (A) e corrigidos pelo peso corporal no momento da eutanásia (B). SED-CO (n=24), TF-CO (n=26), SED-CAF (n=23) e TF-CAF (n=24). Índice de adiposidade corporal (C). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤0,05 sendo, *vs. TF-CO e TF-CAF, #vs. SED-CO, TF-CO e TF-CAF.

Calculamos também o diâmetro de adipócitos isolados do TAB-PE. Conforme pode ser observado nas FIGURAS 9A e 9B, o grupo SED-CAF apresentou maior diâmetro quando comparados aos demais grupos experimentais e, o treinamento físico impediu a resposta hipertrófica induzida pela dieta de cafeteria.

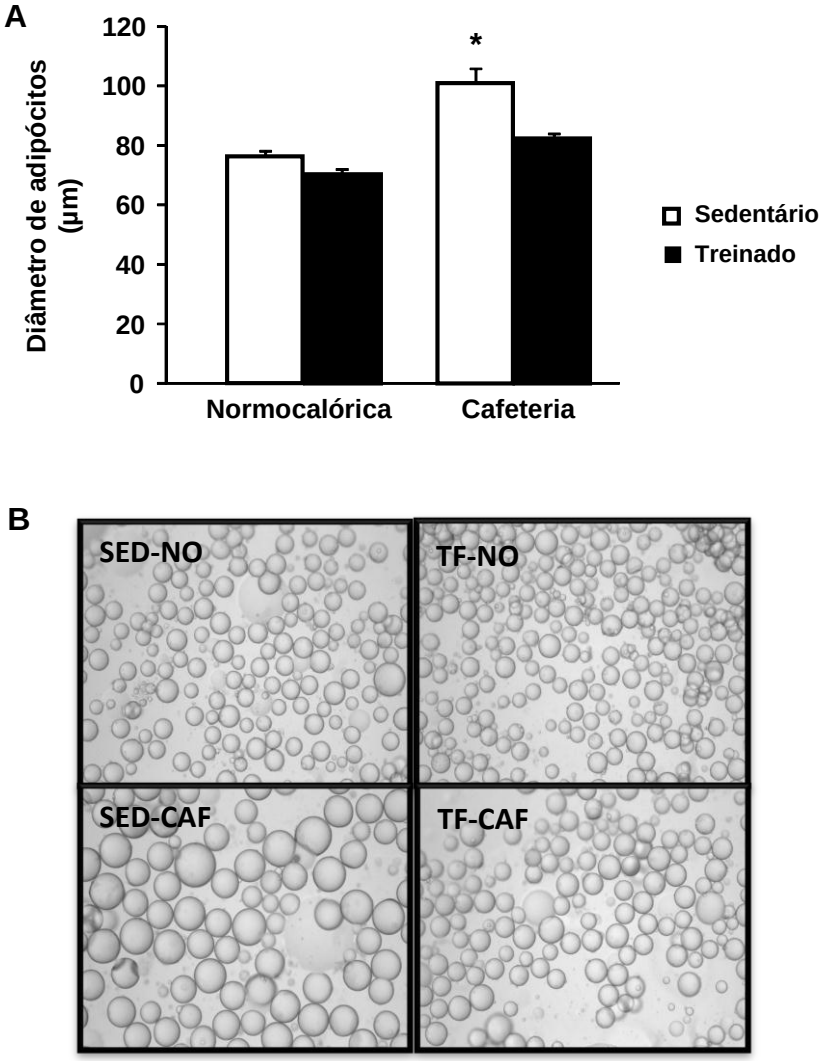


FIGURA 9 - Valores médios do diâmetro de 100 adipócitos do TAB-PE (A). Imagem dos adipócitos obtida em microscópio com aumento de 10X (B). SED-NO (n=9), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=9) e TF-CAF (n=10). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

Não houve diferença estatística no peso relativo dos músculos (gastrocnêmios, plantar e sóleos) e dos órgãos (rins, pulmão e baço). O grupo SED-CAF apresentou menor peso relativo do fígado em relação ao grupo TF-CO (TABELA 4). O grupo TF-NO apresentou maior peso relativo do coração e do ventrículo esquerdo em relação aos grupos SED-NO e SED-CAF (TABELA 4).

TABELA 4- Peso de tecido e órgãos

Peso relativo (mg/g)	SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
Músculo esquelético				
Gastrocnêmio	10,34±0,18	10,51±0,18	10,17±0,26	10,25±0,25
Plantar	1,20±0,04	1,31±0,07	1,15±0,04	1,21±0,04
Sóleos	0,62±0,02	0,67±0,03	0,65±0,04	0,067±0,03
Órgãos				
Fígado	37,47±1,01	40,16±1,42	34,17±0,61*	37,05±1,19
Pulmão	6,10±0,26	6,63±0,19	6,20±0,19	6,25±0,57
Rins	8,75±0,17	10,03±0,49	8,68±0,22	9,00±0,26
Baço	3,25±0,13	3,71±0,17	3,70±0,31	3,56±0,29
Coração				
Coração	4,24±0,10	4,81±0,17#	3,82±0,07	4,38±0,18
Ventrículo direito	3,22±0,08	3,76±0,15#	2,93±0,06	3,39±0,17

Peso relativo dos órgãos pesados no momento da eutanásia. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. TF-NO, #vs. SED-NO e SED-CAF.

5.2. Fatores que contribuem para o balanço energético

Conforme demonstrado na FIGURA 10A e 10B, não houve diferença estatística no consumo alimentar tanto em gramas quanto em quilocalorias entre os grupos.

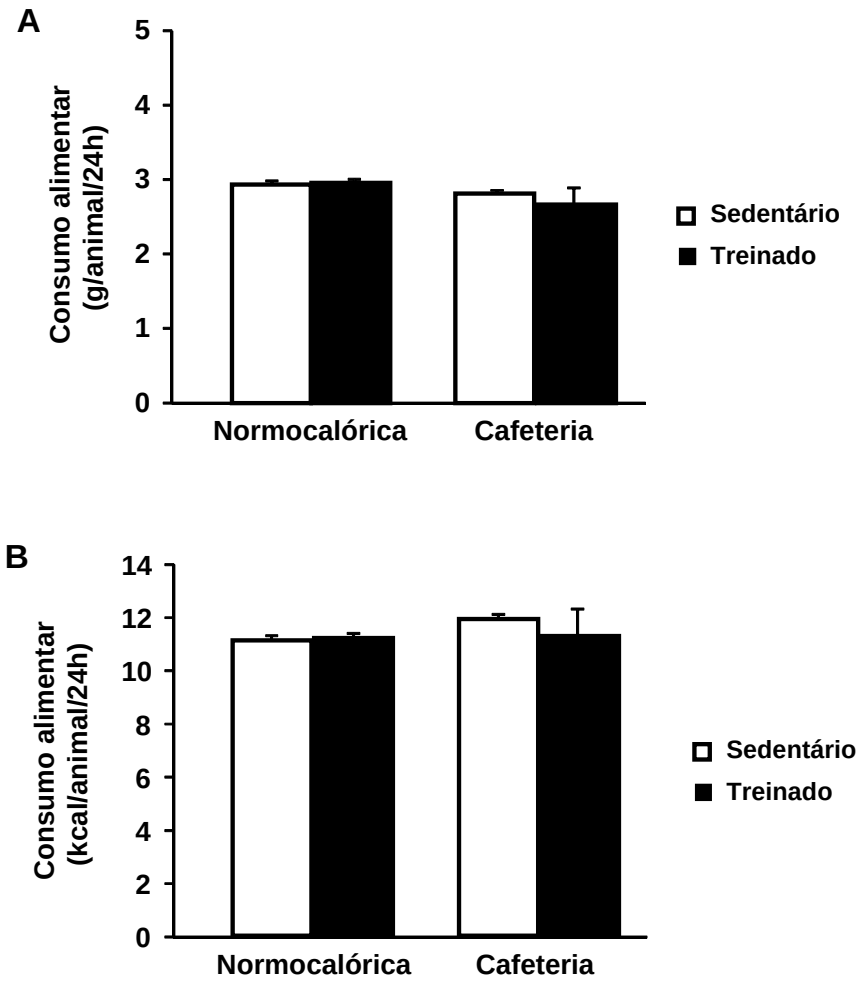


FIGURA 10 - Média do consumo alimentar diário em gramas (A) e em quilocalorias (B) durante o protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média.

O gasto energético em repouso foi avaliado através de três diferentes métodos. Conforme demonstrado na FIGURA 11A, não houve diferença estatística no consumo de oxigênio em repouso entre os grupos experimentais. Ao avaliarmos a temperatura central dos animais antes de iniciar o protocolo experimental, não foram encontradas diferenças entre os grupos (FIGURA 11B). No entanto, no término do protocolo experimental, os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menores valores de temperatura central tanto quando comparados aos grupos SED-NO e SED-CAF no período após protocolo experimental, quanto quando comparados a seus respectivos valores prévios ao treinamento físico. Finalmente, analisamos a perda de peso induzida por jejum de 8 horas, e conforme pode ser observado na FIGURA 11C, o grupo TF-NO apresentou maior perda de peso corporal após jejum comparado ao grupo SED-CAF.

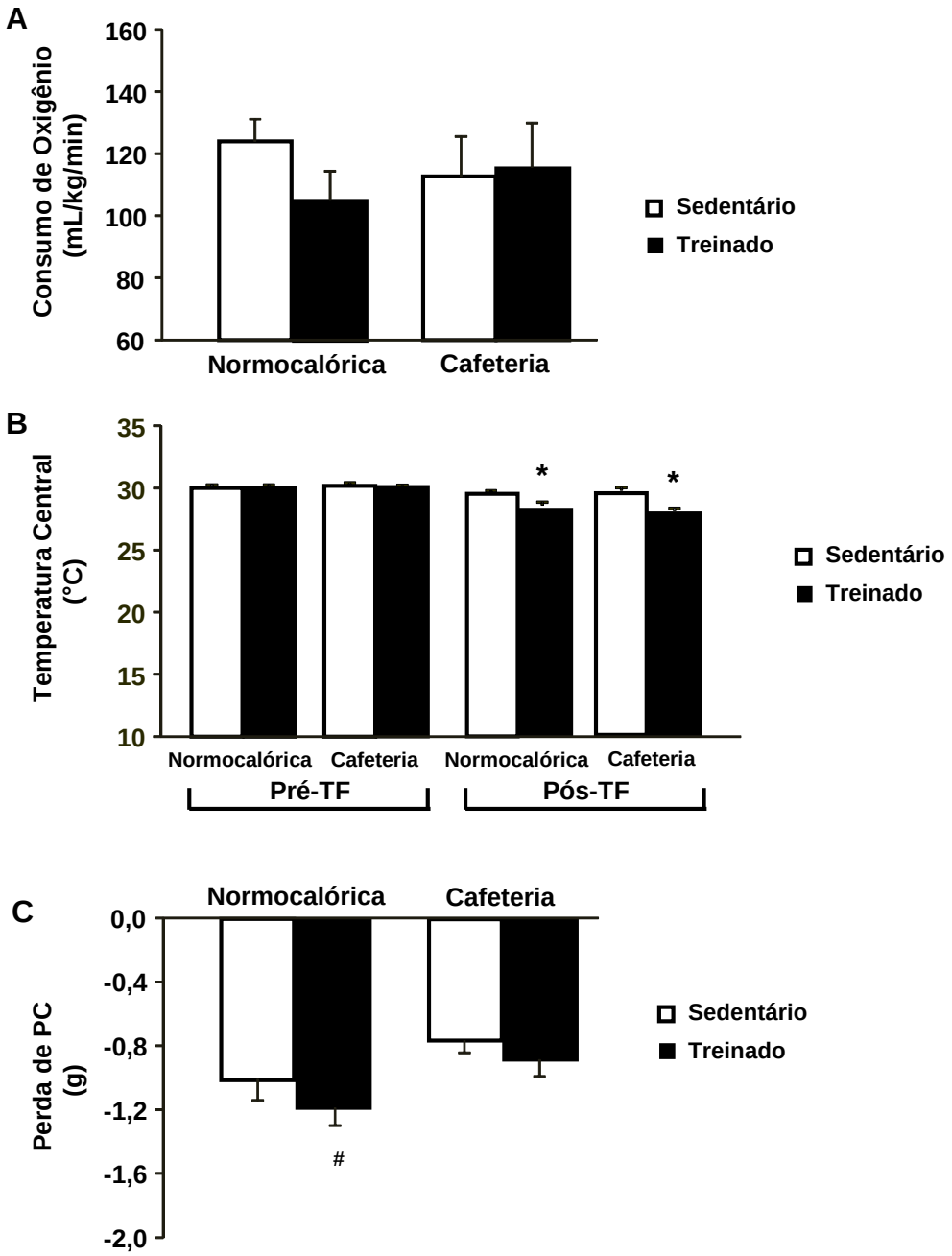


FIGURA 11 - Consumo de oxigênio em repouso avaliado por calorimetria indireta (A). SED-NO (n=5) TF-NO (n=5) SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=5). Temperatura corporal avaliada antes e após protocolo experimental (B). Perda de peso corporal induzida pelo jejum de 8 horas (C). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10) e TF-CAF (n=12). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8), #vs. SED-CAF.

5.3. Eficácia do treinamento físico

Como pode ser visto na FIGURA 12A, antes do início do protocolo experimental, o desempenho dos animais no teste de esforço na esteira foi semelhante. No entanto, ao término do protocolo, observamos maiores tempos de exercício físico até a exaustão nos grupos TF-NO e TF-CAF tanto quando comparados aos grupos SED-NO e SED-CAF no período após protocolo experimental quanto quando comparados aos seus respectivos valores prévios ao treinamento físico.

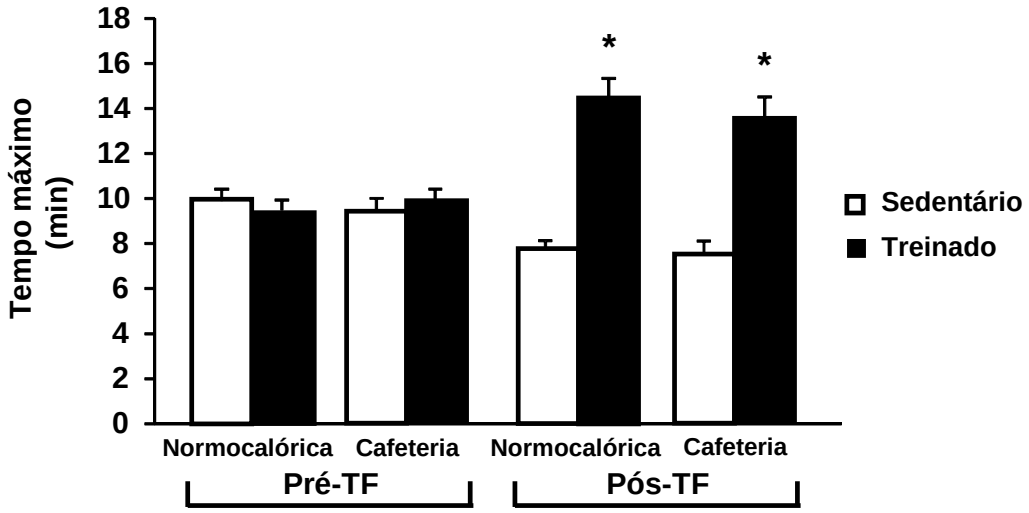


FIGURA 12 - Tempo total percorrido durante teste de tolerância ao esforço físico em esteira antes e após protocolo experimental (A). SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15) e TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8).

5.4. Análise hemodinâmica

Conforme mostra a FIGURA 13A, não houve diferença estatística nos valores de pressão arterial média entre os grupos experimentais. Entretanto, após 8 semanas de treinamento físico, os grupos treinados (TF-CO e TF-CAF) apresentaram bradicardia de repouso (FIGURA 13B).

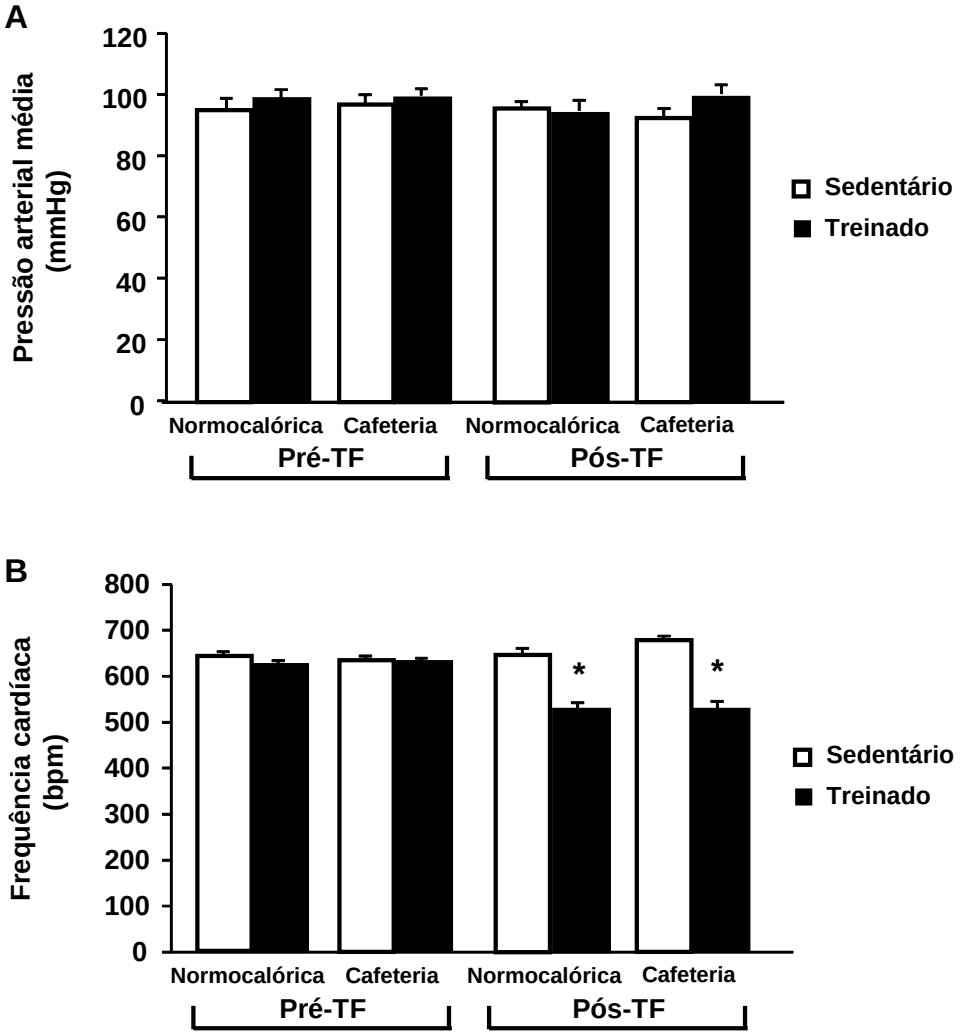


FIGURA 13 - Medidas indiretas de pressão arterial média (A) e frequência cardíaca de repouso (B) avaliados antes e após protocolo experimental. SED-NO (n=15), TF-NO (n=18), SED-CAF (n=15), TF-CAF (n=18). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 0), TF-NO (sem 0), SED-CAF (sem 0), TF-CAF (sem 0), SED-NO (sem 8) e SED-CAF (sem 8).

5.5. Respostas do metabolismo de glicose

Ao avaliarmos a glicemia de jejum dos animais antes de iniciar o protocolo experimental, não foi observada diferença estatística entre os grupos (SED-NO= 136±5,71 mg/dL; TF-NO= 126±4,15 mg/dL; SED-CAF= 123±8,96 mg/dL; TF-CAF= 122±5,03 mg/dL) (FIGURA 14). No entanto, ao reavaliarmos na semana 8, o grupo SED-CAF (143±7,75 mg/dL) apresentou maior glicemia de jejum comparado aos grupos SED-NO e TF-NO (119±5,49 mg/dL e 118±8,09 mg/dL, respectivamente). Por outro lado, não observamos diferença estatística entre os grupos TF-CAF, SED-NO e TF-NO, indicando que o treinamento físico foi capaz de prevenir o aumento da glicemia de jejum induzido por dieta de cafeteria (FIGURA 14).

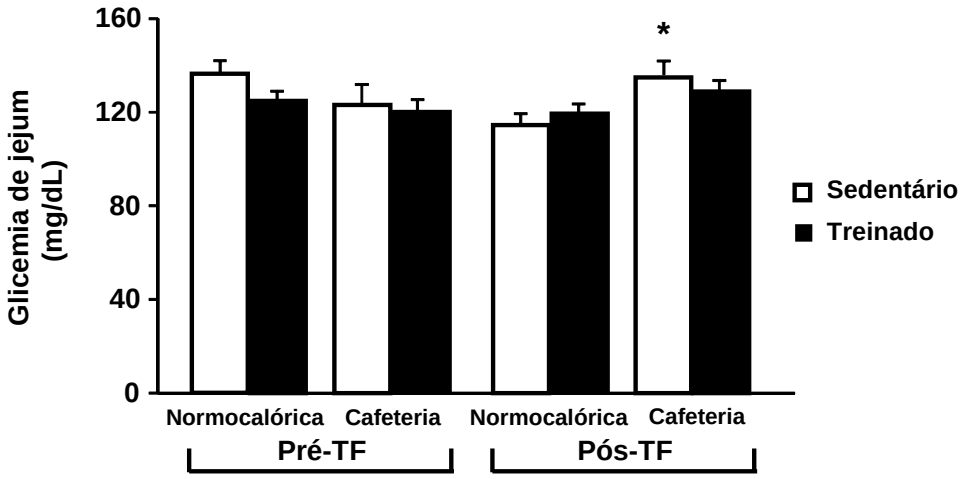
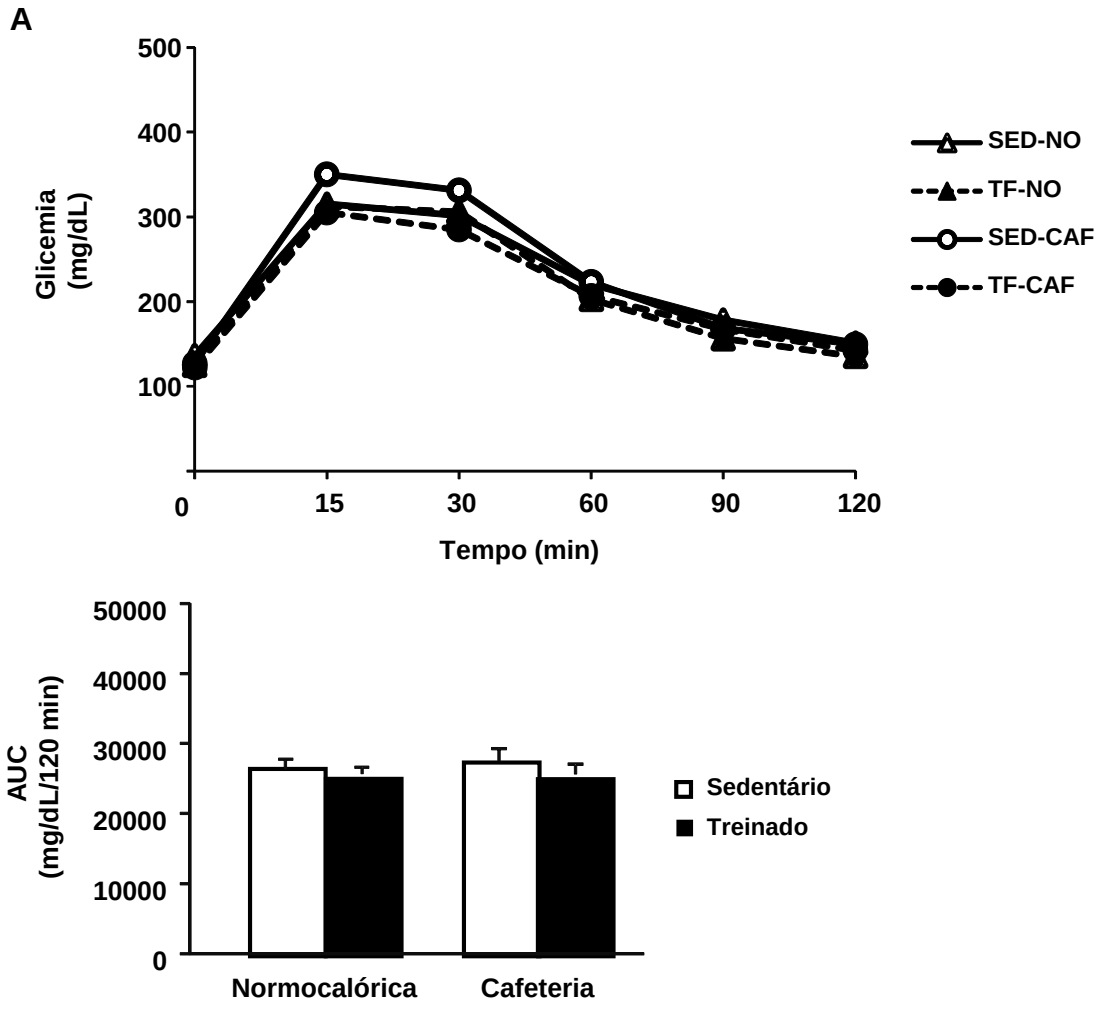


FIGURA 14 - Glicemia de jejum avaliada antes e após protocolo experimental (A). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10), TF-CAF (n=13). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (sem 8) e TF-NO (sem 8).

Ao avaliarmos a tolerância à glicose antes de iniciar o protocolo experimental, não foi observada diferença estatística entre os grupos (FIGURA 15A). No entanto, quando reavaliamos no final do protocolo experimental, o grupo SED-CAF apresentou maior área sobre a curva (AUC) (FIGURA 15B) quando comparados aos demais grupos. Interessante observar que não houve diferença na AUC na semana

8 entre os grupos treinados TF-NO e TF-CAF. Esses dados confirmam que o treinamento físico preveniu a intolerância à glicose induzida por dieta de cafeteria.



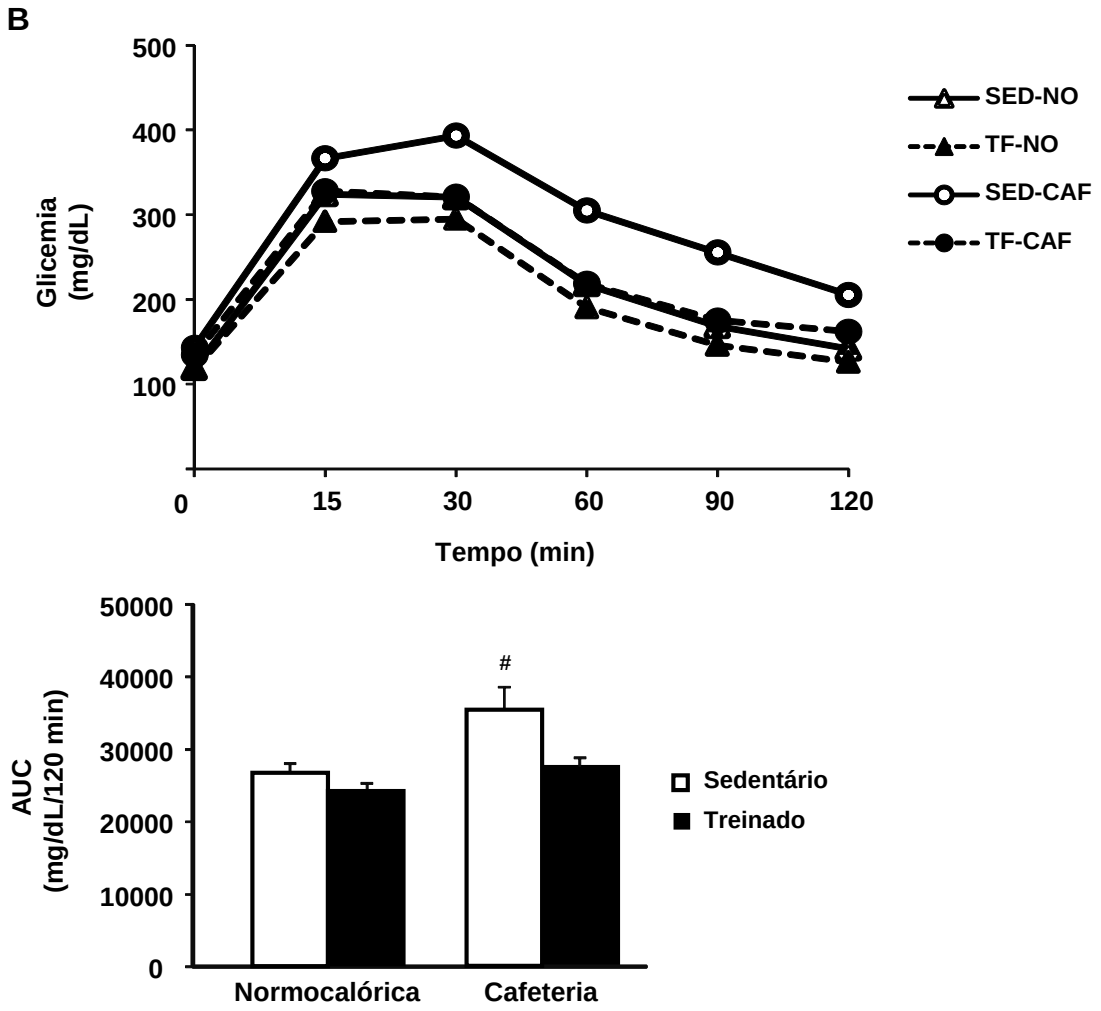


FIGURA 15 - Curva glicêmica referente ao teste de tolerância à glicose e AUC avaliado antes (A) e após protocolo experimental (B). SED-NO (n=10), TF-NO (n=13), SED-CAF (n=10), TF-CAF (n=13Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, #vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

Ainda, avaliamos também a tolerância à insulina no final do protocolo experimental. Conforme mostra a FIGURA 16, o grupo SED-CAF apresentou menor kITT quando comparados aos demais grupos, confirmando que a dieta de cafeteria provocou resistência à insulina, e que o treinamento físico foi capaz de impedir essa resposta no grupo TF-CAF.

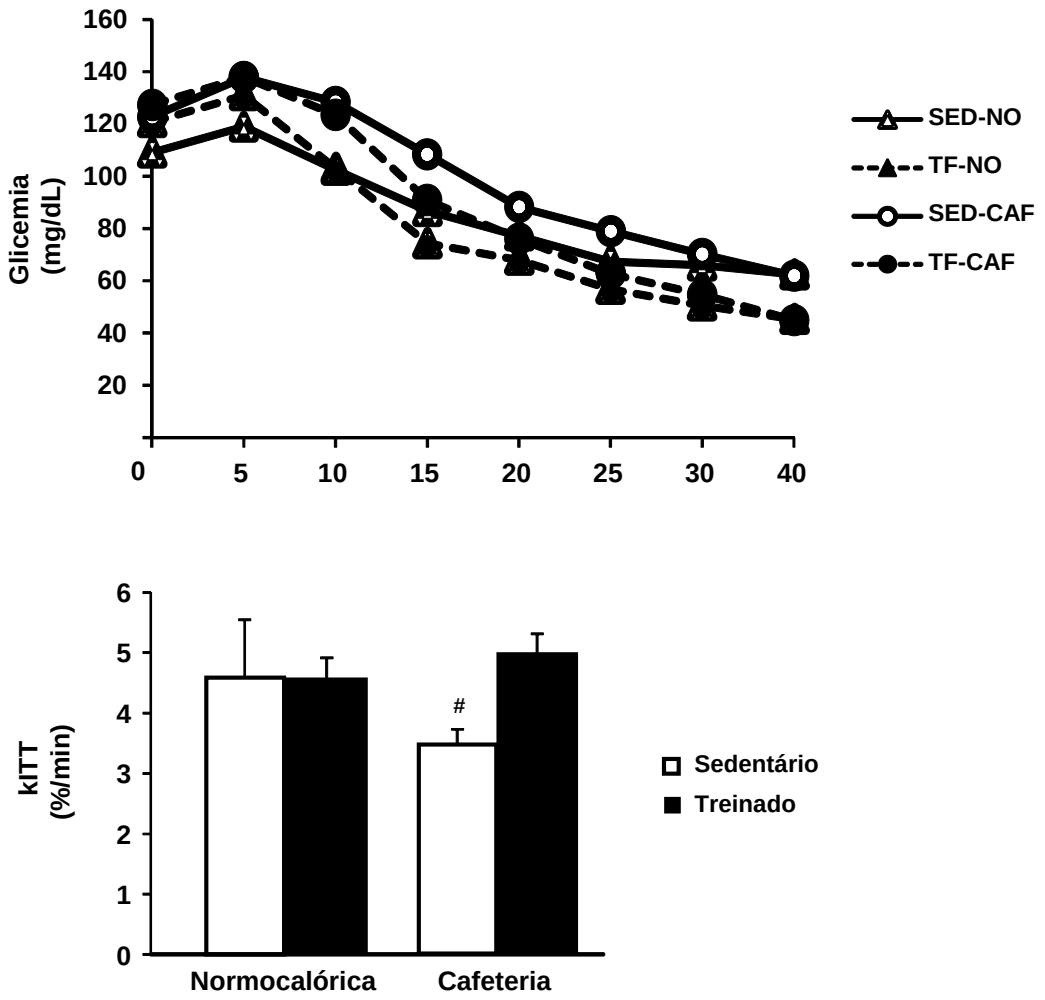


FIGURA 16 - Curva glicêmica referente ao teste de tolerância à insulina e kITT avaliado após protocolo experimental. SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=8), TF-CAF (n=7). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, #vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

5.6. Dosagens séricas

Avaliamos a concentração sérica da insulina, leptina, adiponectina e perfil lipidico do soro coletado no momento da eutanásia. Como pode ser observado na TABELA 5, o grupo SED-CAF apresentou maior concentração sérica de insulina e leptina e menor concentração de adiponectina comparados aos demais grupos. Além disso, o treinamento físico aumentou a concentração sérica de adiponectina, independentemente da dieta (TABELA 5). O grupo SED-CAF apresentou maior concentração de colesterol total e LDL-c quando comparado aos grupos SED-NO e TF-NO (TABELA 5). Ainda, o grupo SED-CAF apresentou maior conentração de HDL-c comparados com os grupos TF-NO e TF-CAF (TABELA 5).

TABELA 5 - Dosagens séricas

	SED-NO	**TF-NO**	**SED-CAF**	**TF-CAF**
Insulina (ng/mL)	0,3±0,1	0,4±0,1	0,6±0,1*	0,5±0,1
Leptina (ng/mL)	4,4±0,7	3,7±0,5	8,2±0,7	5,3±0,7
Adiponectina (ng/mL)	22,6±0,9	29,2±0,8#	16,2±0,9*	28,2±0,7#
Colesterol (mg/dL)	84,8±3,0	91,4±4,7	131,0±2,4&	99,9±4,9
TG (mg/dL)	43,0±6,1	43,1±3,8	39,7±5,0	33,0±3,0
HDL-c (mg/dL)	57,5±4,4	57,8±3,5	70,6±4,4%	52,4±4,4
LDL-c (mg/dL)	22,1±3,5	23,4±4,6	52,6±5,3	41,4±5,9
VLDL-c (mg/dL)	8,6±1,2	8,6±0,7	7,9±1,0	6,1±0,8

Concentração sérica dos animais após protocolo experimental. SED-NO (n=7-9), TF-NO (n=7-9), SED-CAF (n=7-9), TF-CAF (7-9). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF, #vs. SED-NO e SED-CAF, &vs. SED-NO e TF-NO, %vs. TF-NO e TF-CAF.

5.7. Atividade lipolítica do TAB

A atividade lipolítica foi avaliada através da dosagem de glicerol em adipócitos isolados do depósito de gordura peripididimal. Conforme mostra a FIGURA 17, não houve diferença entre os grupos na atividade lipolitica basal. Entretanto, quando estimulado com isoproterenol, os grupos TF-NO, SED-CAF e TF-CAF apresentaram maior concentração de glicerol em relação ao grupo SED-NO, portanto, maior atividade lipolítica (FIGURA 17).

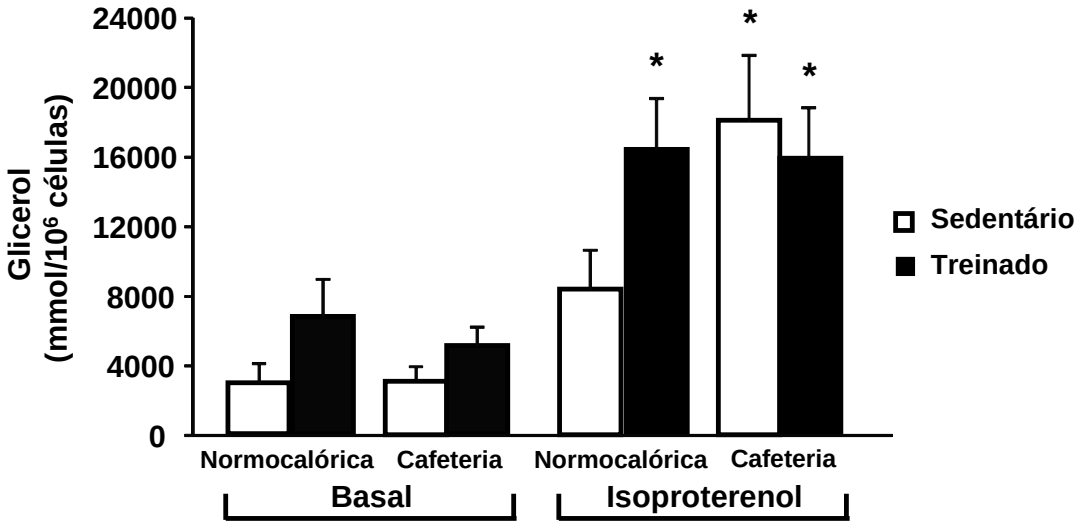


FIGURA 17 - Atividade lipolítica basal e estimulada por isoproterenol avaliada através da concentração de glicerol de adipócitos isolados dos animais após protocolo experimental. SED-NO (n=9), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=9) e TF-CAF (n=9). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO (isoproterenol).

5.8. Lipogênese *de novo* no TAB

As avaliações da atividade enzimática da ácido graxo sintase (FAS) e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foram realizadas como marcadoras de lipogênese *de novo*. O grupo SED-CAF apresentou menor atividade da FAS em relação aos grupos SED-NO e TF-NO (FIGURA 18A). Já em relação a G6PDH, os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menor atividade em relação aos grupos SED-NO e SED-CAF (FIGURA 18B).

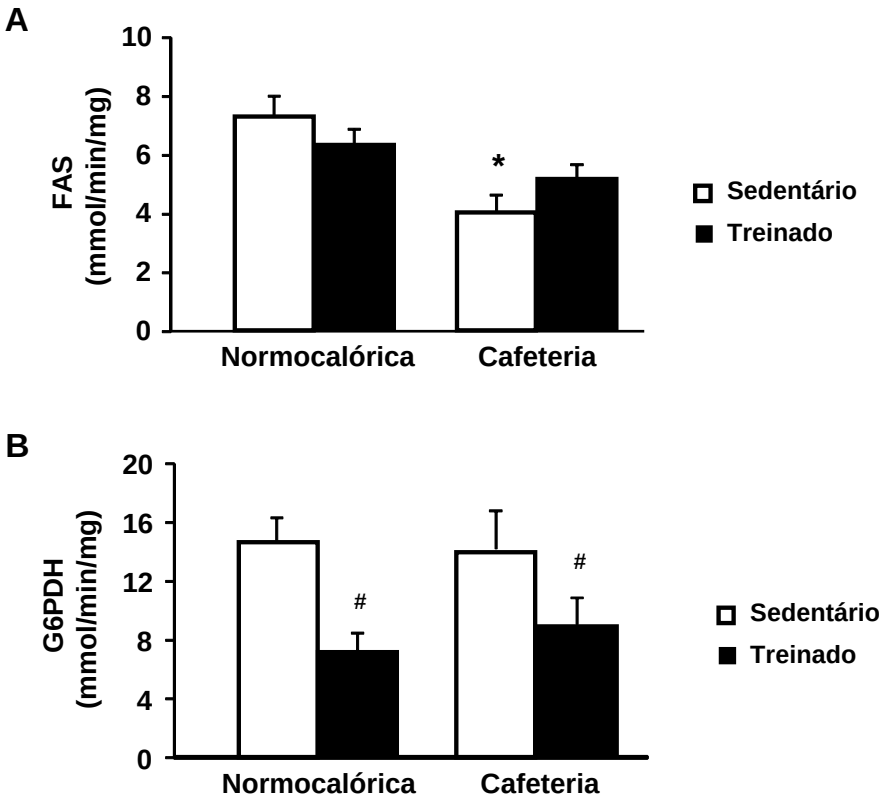


FIGURA 18 - Atividade enzimática da FAS no TAB-RP (A). SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=6) e TF-CAF (n=8). Atividade enzimática da G6PDH no TAB-RP (B). SED-NO (n=11), TF-NO (n=9), SED-CAF (n=10) e TF-CAF (n=10). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para $p \leq 0,05$ sendo, *vs. SED-NO e TF-NO, #vs. SED-NO e SED-CAF.

5.9. Atividade oxidativa no TAB

Para caracterizar a capacidade oxidativa no TAB, avaliamos a atividade da enzima citrato sintase. Conforme mostra a FIGURA 19, o grupo SED-CAF apresentou menor atividade enzimática quando comparado aos demais grupos. Interessante observar que, o treinamento físico foi capaz de prevenir essa redução induzida pela dieta de cafeteria.

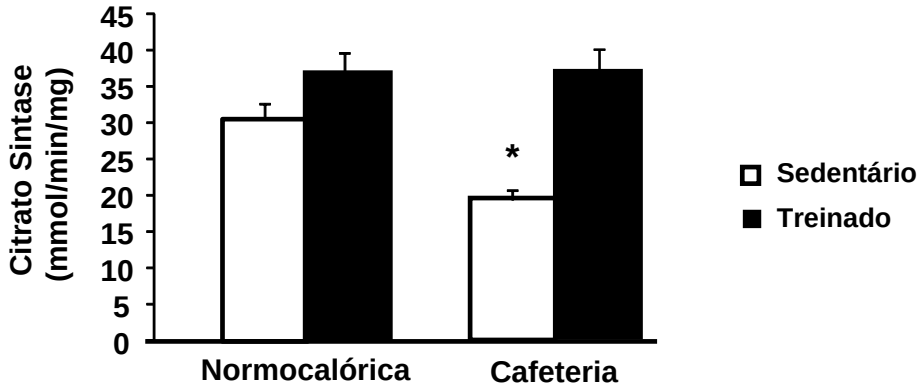


FIGURA 19 - Atividade enzimática da citrato sintase no TAB-PE. SED-NO (n=8), TF-NO (n=6), SED-CAF (n=6) e TF-CAF (n=8). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

5.10. Quantificação proteica da AMPK e da ACC

Conforme mostrado nas FIGURAS 20A e 20B, o grupo SED-CAF apresentou menor expressão proteica da AMPK e p-AMPK (Thr 172) no TAB comparado aos demais grupos experimentais. Além disso, os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram maior expressão proteica da p-AMPK (Thr 172) no TAB quando comparados aos grupos sedentários (SED-NO e SED-CAF).

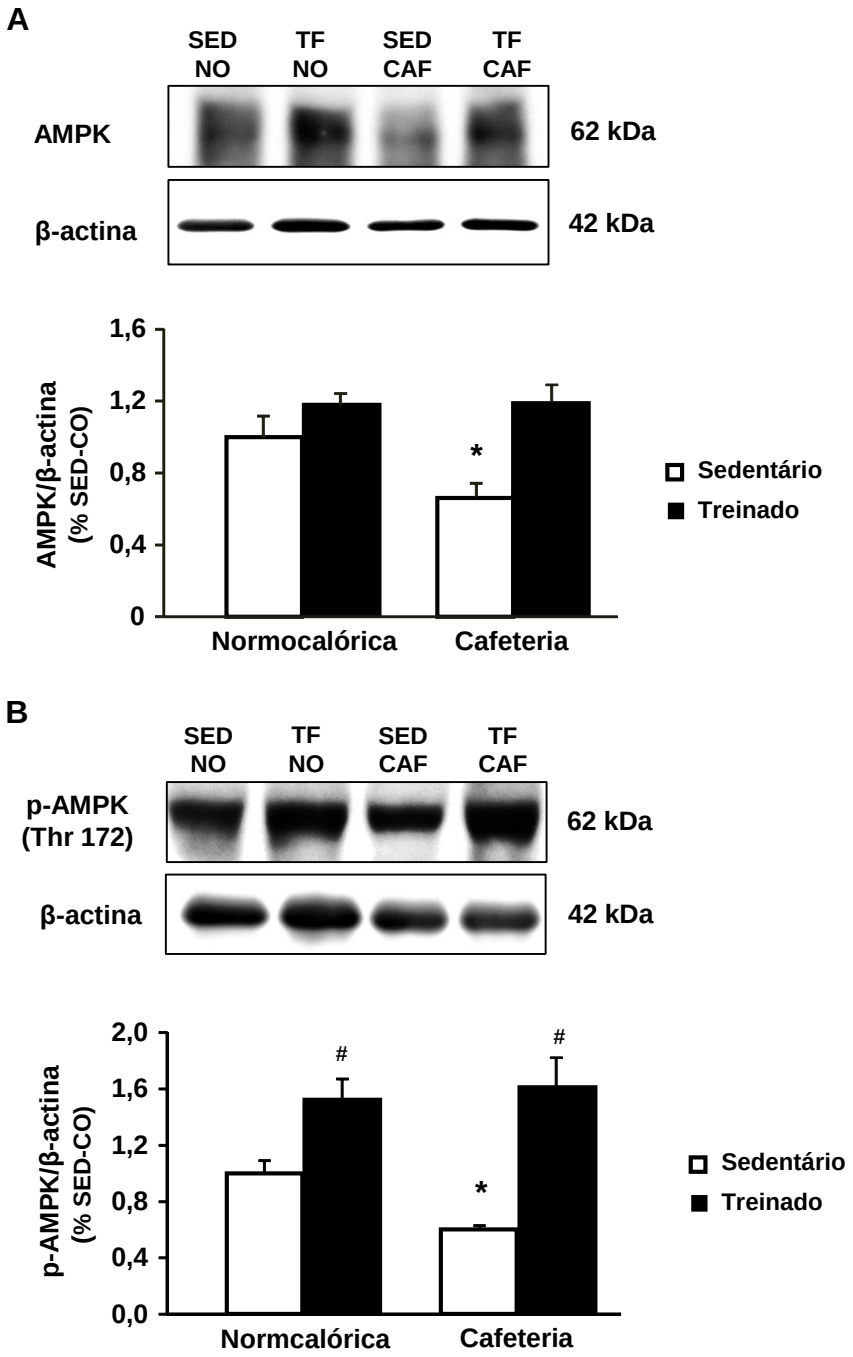


FIGURA 20 - Expressão proteica da AMPK (A) e p-AMPK (Thr 172) (B). SED-NO (n=5), TF-NO (n=5), SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=4). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF, #vs. SED-NO e SED-CAF.

Conforme mostrado nas FIGURAS 21A e 21B, o grupo SED-CAF apresentou menor expressão proteica da ACC e p-ACC (Ser 79) em relação aos demais grupos. Interessante ressaltar, o treinamento físico aeróbio impediu essa resposta já que o conteúdo dessa enzima foi semelhante entre os grupos TF-NO e TF-CAF.

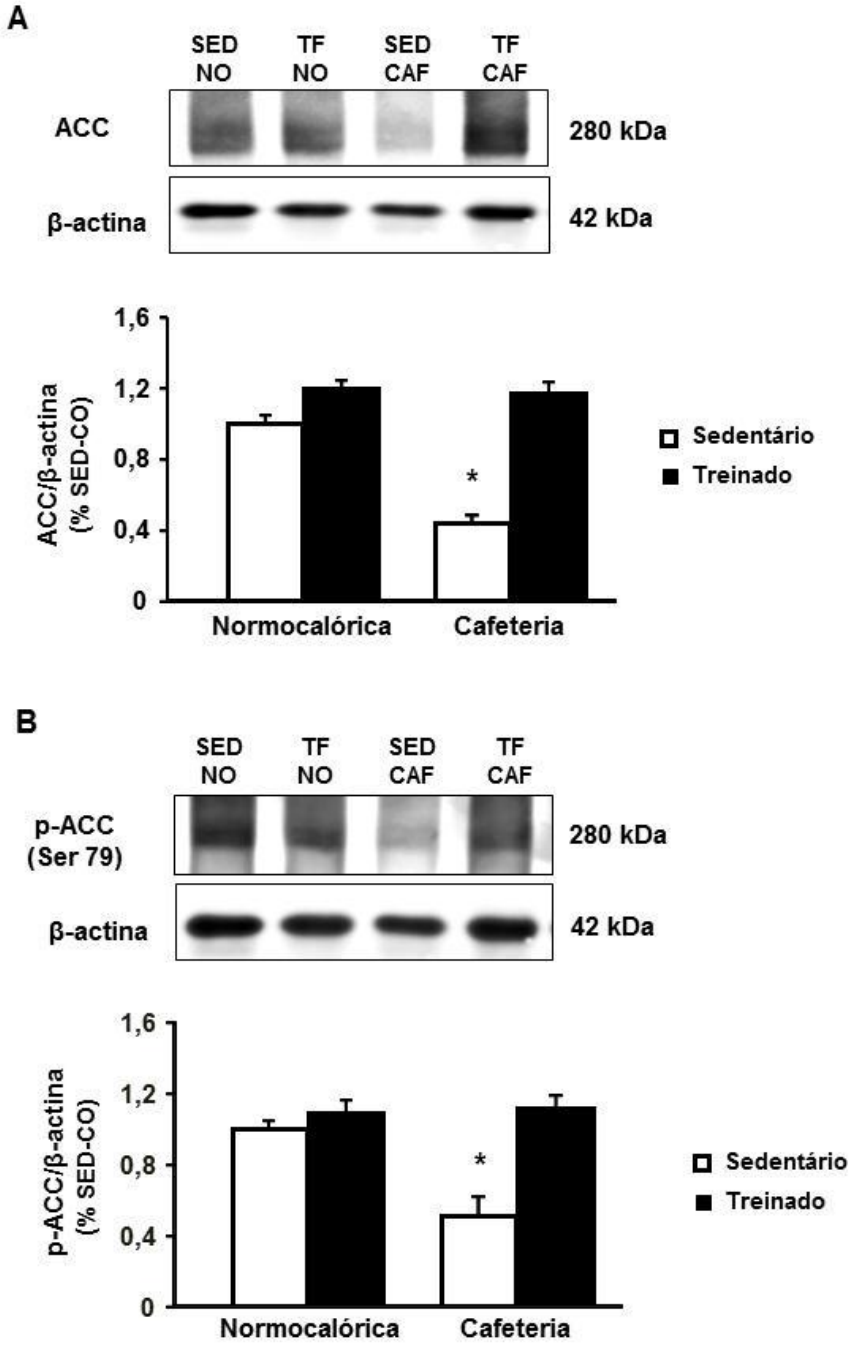


FIGURA 21- Expressão proteica da ACC (A) e p-ACC (Ser 79) (B). SED-NO (n=5), TF-NO (n=5), SED-CAF (n=5) e TF-CAF (n=4). Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância estatística para p≤ 0,05 sendo, *vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

6. DISCUSSÃO

O treinamento físico aeróbico tem sido utilizado como ferramenta importante para o controle de peso corporal e tratamento não farmacológico da obesidade (IRVING et al., 2008; HUNTER et al., 2010). Estudos transversais observacionais que avaliaram os níveis de aptidão física em populações distintas mostraram que, a prática regular de exercícios físicos acima de 30 min/dia, 5 vezes por semana, está associada com redução de risco de diabetes tipo 2 e obesidade, independente do método de avaliação utilizada, faixa etária e métodos estatísticos (HELMRICH et al., 1991; HU et al., 1999).

No presente estudo, demonstramos que o treinamento físico foi eficaz para a prevenção do ganho de peso corporal e de adiposidade nos grupos TF-NO e TF-CAF, independente da dieta utilizada. Nossos dados corroboraram o estudo de Vaisy et al. (2011), que observaram menor ganho de peso corporal e de peso do TAB-PE em ratos alimentados com dieta de cafeteria durante 12 semanas e submetidos ao treinamento físico com natação por 1 hora ao dia, 5 vezes/semana, durante 4 semanas.

Quando não associado à dieta de cafeteria, o treinamento físico pode reduzir o peso corporal e a adiposidade, conforme demonstrado no estudo de Benatti et al. (2008). Entretanto, esses dados são contraditórios na literatura, pois quando o gasto energético é compensado pelo aumento na ingestão calórica dos animais, o peso corporal permanece o mesmo até o final do protocolo de treinamento físico, conforme demonstrado pelo nosso grupo (HIGA et al., 2012).

Quando avaliamos o grau de hipertrofia das células adiposas extraídas do TAB-EP, identificamos hipertrofia significativa no grupo SED-CAF comparado aos outros grupos, revelando o potencial do treinamento físico para impedir o aumento do diâmetro das células. Esses dados corroboram os dados de peso dos depósitos de TAB do presente estudo, e também outros estudos publicados na literatura, tais como o de Gollisch et al. (2009), que mostraram menor diâmetro de adipócitos em animais alimentados com dieta hipercalórica submetidos ao treinamento físico comparados aos sedentários, e o estudo de Guerra et al. (2007), que demonstraram

redução do peso e área dos adipócitos de ratos treinados submetidos à dieta rica em colesterol.

Diversos sistemas regulatórios permitem a manutenção da homeostasia de peso corporal ao longo da vida. Alterações no balanço energético oriundas da ingestão calórica e/ou do gasto energético são capazes de alterar o peso corporal (Tappy et al., 2003). Investigamos no presente estudo, a influência do treinamento físico sobre o balanço energético através da medida do consumo alimentar 24 horas e do metabolismo energético de repouso através de três métodos, a calorimetria indireta, temperatura central e a perda de peso corporal induzida por jejum de 8 horas.

Evidências na literatura sobre os hábitos alimentares de indivíduos e animais submetidos ao treinamento físico demonstraram que o consumo alimentar tanto em gramas quanto em quilocalorias pode aumentar em decorrência do maior gasto energético promovido pelo treinamento físico (D'ANGELO et al., 2010; HIGA et al., 2012). Entretanto, no presente estudo, o treinamento físico não resultou em maior consumo alimentar dos animais treinados (TF-NO e TF-CAF), independente da dieta. Eguchi et al. (2008) utilizando dietas de cafeteria e controle, não encontraram diferença no consumo alimentar dos grupos treinados com natação. Já Gollisch et al. (2009) demonstraram aumento do consumo alimentar por animais treinados independente da dieta (normocalórica ou hiperlipídica). Esses dados contraditórios podem ser explicados pelas diferenças metodológicas existente entre os estudos, tais como tipos de dietas, tipo de treinamento físico, duração e intensidade, e por fim, possíveis alterações de fatores neuroendócrinos reguladores do apetite e saciedade (EGUCHI et al., 2008).

Em relação à taxa metabólica avaliada por calorimetria indireta, não encontramos diferença estatística entre os grupos. Esses dados vão de encontro aos dados demonstrados previamente pelo nosso grupo (HIGA et al., 2012) e por outros estudos (BROEDER et al.,1992; WHYBROW et al.,2008). Porém, alguns estudos apresentam resultados contrários, justificando o aumento da taxa metabólica de repouso em função do aumento da massa muscular (POEHLMAN et al., 1989; CEDDIA, 2002; TREVISAN; BURINI, 2007). Em nosso estudo, não encontramos diferença estatística entre os grupos na massa dos músculos

esqueléticos, o que pode justificar parcialmente a manutenção da taxa metabólica de repouso.

Como demonstrado nos resultados, os grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) apresentaram menor temperatura central em relação aos grupos sedentários (SED-NO e SED-CAF) após 8 semanas de treinamento físico. De acordo com Boos et al. (1999), a redução na temperatura central é modulada por uma menor ativação das proteínas desacopladoras 1 e 2 (UCP-1 e UCP-2) no músculo esquelético e coração e, essa resposta, favorece o armazenamento de energia no músculo esquelético durante a fase de recuperação e permite uma maior capacidade para executar trabalho mecânico durante exercícios subsequentes.

Já quando o gasto energético foi avaliado indiretamente pela perda de peso corporal induzida por jejum de 8 horas, cujos resultados nos possibilitaram uma simples aproximação do gasto energético em função da eliminação da ingestão calórica, somente o grupo TF-NO apresentou maior perda de peso corporal em comparação aos demais grupos, indicando maior ativação metabólica associada ao jejum.

Considerando que o balanço energético é determinado pela diferença entre o conteúdo calórico ingerido e o conteúdo calórico consumido tanto em repouso quanto durante o treinamento físico, os dados obtidos mostraram que o menor ganho de peso corporal dos animais treinados possivelmente seja consequente do gasto energético promovido pelo treinamento físico, já que tanto a ingestão calórica quanto o gasto energético de repouso não apresentaram alterações significativas compatíveis com as respostas de peso corporal e adiposidade dos grupos. Esses dados são sugestivos, haja vista a ausência de avaliação do gasto energético durante o treinamento físico.

Diversos estudos na literatura relacionaram o aumento da adiposidade corporal com alterações no metabolismo de glicose (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006; SCHRAUWEN, 2007; SORIGUER et al., 2012). De fato, em nosso estudo os animais SED-CAF apresentaram aumento de 30% (vs. SED-NO) da adiposidade corporal que refletiu no aumento de 18% (vs. SED-NO) da glicemia de jejum. No mesmo sentido, Blumenkrantz (1997), mostrou que para aumentos de 10% na adiposidade corporal, pode-se observar aumento em 2mg/dl na glicemia de jejum em humanos.

Ainda, Abbasi et al. (2002) observaram que indivíduos com maiores valores de Índice de Massa Corporal (IMC) apresentaram prejuízo na resposta glicêmica durante o teste de tolerância à glicose. De fato, indivíduos diabéticos e intolerantes à glicose apresentam maior tamanho de adipócitos quando comparados com indivíduos normoglicêmicos (WEYER et al., 2000).

Hammarstedt; Graham; Kahn (2012) mostraram que a hipertrofia de adipócitos em humanos *per se* diminui a sensibilidade à insulina através da redução expressão de GLUT4 e níveis séricos de adiponectina. Além disso, tanto seres humanos quanto animais diabéticos apresentam redução significativa na expressão de proteínas da via de sinalização da insulina como PI3K (SMITH et al., 1999), IRS1 (BURÈN et al., 2003) e GLUT4 (HUSSEY et al., 2011) e, consequentemente menor captação de glicose no TAB.

Como demonstrado nos resultados, o treinamento físico impediu o aumento da glicemia de jejum, o desenvolvimento de intolerância à glicose, resistência à insulina e hiperinsulinemia induzida pela dieta de cafeteria. Hansen et al. (2009) demonstraram que 6 meses de treinamento físico resultaram em redução do peso corporal, aumento da capacidade cardiorrespiratória e diminuição da concentração de hemoglobina glicada de indivíduos obesos e diabéticos. No mesmo sentido, Vieira et al. (2009) mostraram que o treinamento físico aeróbico reduziu a glicemia de jejum e a hiperinsulinemia de camundongos obesos induzido por dieta hiperlipídica. No presente trabalho, confirmamos que o treinamento físico também é eficaz para a prevenção do desenvolvimento de diabetes tipo 2, mesmo mediante o consumo de dieta de cafeteria.

Por influenciar a massa adiposa, o treinamento físico também exerce–papel importante na modulação da secreção de adipocinas como a leptina e a adiponectina que contribuem para a regulação da homeostasia glicêmica. Em indivíduos obesos e diabéticos as concentrações de leptina estão aumentadas (JIANG et al., 2009; MARTINS; LIMA; FONSECA, 2012) e as concentrações de adiponectina reduzidas (SEO et al. 2004; BLÜHER et al. 2007). Em nosso estudo, os animais SED-CAF apresentaram maior concentração de leptina e menor concentração de adiponectina em relação aos demais grupos. A secreção de proteínas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6 também aumentam com a obesidade

(LUI; LIU, 2010). De fato, a secreção de TNF-α tem sido relacionada com a diminuição da secreção de adiponectina através da inibição de PPAR-γ, principal fator de transcrição para essa adipocina (PHILLIPS; KUNG, 2010; KURSAWE et al., 2010; LIU; LIU, 2010).

Os efeitos do treinamento físico sobre a concentração dessas adipocinas ainda não estão bem claros na literatura. O efeito do treinamento físico sobre a concentração de leptina ainda é controverso, pois alguns observaram redução dos níveis de leptina após o treinamento físico (BENATTI et al., 2008) enquanto outros não (BOUASSIDA et al., 2008; HIGA et al., 2012). No presente estudo, o treinamento físico impediu o aumento da leptina na presença da dieta de cafeteria. Entretanto, não observamos redução da concentração dessa adipocina, mesmo com a redução da massa adiposa dos grupos treinados (TF-NO e TF-CAF), sugerindo que outros mecanismos possam influenciar a produção de leptina além da modificação da massa adiposa.

Em relação a adiponectina, os grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) apresentaram aumento significativo na concentração sérica quando comparados com os grupos sedentário (SED-NO e SED-CAF). Esses dados corroboram os encontrados por Zeng et al. (2007) e Lim et al. (2008). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, aumenta a captação de glicose e oxidação de AG tanto no músculo esquelético quanto no TAB e, essas respostas parecem estar associadas à ativação da AMPK pela adiponectina nesses tecidos. Dessa forma, o aumento da concentração sérica induzida pelo treinamento físico pode ser um dos mecanismos protetores contra o desenvolvimento do diabetes nesse modelo experimental. Entretanto, outros estudos na literatura não encontraram alterações na expressão (HIGA et al., 2012) e concentração de adiponectina após treinamento físico (KIMURA et al., 2006; BOUDOU et al., 2003).

A variedade de resultados encontrados na literatura para a concentração da leptina e adiponectina pode ser justificada pela heterogeneidade das populações avaliadas, pela caracterização do treinamento físico (intensidade, duração e volume), pela alteração da composição corporal ou outros mecanismos ainda não estabelecidos. Miyazaki et al. (2010) demonstraram que o aumento da expressão de mRNA e da concentração sérica de tais adipocinas em resposta ao treinamento

físico parecem estar associados ao tamanho dos adipócitos. De fato, quando animais treinados não apresentaram redução da massa adiposa e do diâmetro de adipócitos, não foram observadas alterações na expressão gênica tanto da leptina quanto da adiponectina no tecido adiposo periepididimal (HIGA et al., 2012).

Com o conjunto de dados apresentados até o momento, ficou evidente que alterações na adiposidade corporal induzidas pelo treinamento físico estão associadas com a prevenção do diabetes tipo 2. Para entender de que forma o TAB contribui para essa resposta, o passo seguinte foi avaliar os processos fisiológicos do TAB de lipólise e lipogênese.

Conforme esperado, o treinamento físico aumentou significativamente a taxa lipolítica do grupo TF-NO comparado ao grupo SED-NO. Esse dado corrobora o achado de De Glizesinski et al. (2009), o que garante o aumento da disponibilidade de AGL para ser oxidado durante o treinamento físico (LIMA-SILVA et al., 2006). Interessante observar que o grupo SED-CAF também aumentou a taxa lipolítica comparado ao grupo SED-NO, revelando a existência de resistência à ação da insulina no tecido adiposo, haja vista a ausência do seu efeito anti-lipolítico (RODEN, 2004; STUMVOLL; GOLDSTEIN; HAEFTEN, 2005). Esses achados corroboram os estudos realizados com indivíduos e animais obesos com aumento crônico da atividade lipolítica (DELARUE; MAGNAN, 2007; JOCKEN; BLAAK, 2008), e com adipócitos isolados de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (WUEEST et al., 2009). Por fim, a taxa lipolítica do grupo TF-CAF também foi maior comparada ao grupo SED-NO, no entanto, não foi diferente dos grupos alimentados com dieta de cafeteria apesar do sinergismo de dieta e treinamento físico.

Embora os grupos treinados e o grupo SED-CAF tenham apresentado maiores taxas lipolíticas, apenas os grupos treinados obtiveram menor adiposidade, sugerindo que uma possível diferença na lipogênese entre os grupos poderia ser o mecanismo pelo qual o TAB prticiparia da prevenção do diabetes tipo 2. Partimos, então, para a análise de duas enzimas que poderiam sinalizar a ativação da via lipogênica *de novo,* a FAS e a G6PDH.

Em nosso estudo, a atividade da FAS reduziu no TAB do grupo SED-CAF. Esse dado inicialmente pareceu contraditório, pois a FAS é considerada uma proteína chave para o processo de lipogênese *de novo* (FONSECA-ALANIZ et al.,

2006). No entanto, apesar de alguns estudos mostrarem aumento da expressão da FAS no TAB de indivíduos e animais obesos (BERNDT et al., 2007; BLÜHER et al., 2007; SHANKAR et al., 2010), nossos dados corroboraram os estudos que encontraram redução na atividade da FAS (TURNER et al., 2007; JIANG et al., 2009; ORTEGA et al., 2010). De acordo com Gaidhu et al. (2009), a inibição do processo lipogênico *de novo* pode ser consequente da redução da atividade da citrato sintase devido a alta disponibilidade de ácido graxo proveniente da dieta e da atividade lipolítica. Além disso, uma redução na produção de citrato também poderia repercutir em diminuição da atividade lipogênica da FAS. Além disso, a supressão da lipogênese *de novo* também poderia ser induzida pela hiperleptinemia, conforme demonstrado por Jiang et al. (2009). Por fim, as alterações oriundas da atividade da G6PDH nos grupos treinados, apesar de alterar o fornecimento de co-fator, não seriam suficientes para alterar a lipogênese *de novo* na ausência da adaptação da FAS.

Considerando que os resultados da via lipogênica *de novo* não são suficientes para explicar os dados de adiposidade e que o aumento da taxa lipolítica possa resultar em grande disponibilidade de ácidos graxos, uma alteração no destino dos ácidos graxos (armazenamento ou oxidação) liberados justificaria os achados iniciais. Nesse sentido, prejuízos na capacidade oxidativa no TAB seriam capazes de refletir em favorecimento do armazenamento dos ácidos graxos no próprio tecido. De fato, quando avaliada a atividade da enzima citrato sintase no TAB, importante marcadora de atividade metabólica oxidativa, o grupo SED-CAF apresentou redução significativa comparada aos demais grupos, confirmando o prejuízo na via de oxidação dos ácidos graxos no TAB com a dieta de cafeteria. Interessante observar que o treinamento físico foi capaz de prevenir essa resposta, resultando em menor adiposidade dos animais.

É importante ressaltar que, apesar de o TAB não ter grande capacidade oxidativa, alterações na oxidação lipídica podem contribuir para o metabolismo lipídico do organismo, já que a massa adiposa tem representação significativa na nossa composição corporal (15 a 20% em indivíduos saudáveis e mais de 40% em indivíduos obesos) (GAIDHU; CEDDIA, 2011). De fato, Gaidhu et al. (2010) mostraram que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento na captação de TG, redução na atividade da citrato sintase e na oxidação de

palmitato no TAB, favorecendo o acúmulo de TG e aumento da adiposidade corporal. Esses dados contribuem diretamente para o entendimento dos nossos resultados, principalmente quando avaliados na presença do treinamento físico.

Com o conjunto de dados obtidos sobre os processos fisiológicos do TAB, é possível afirmar que embora a atividade lipolítica seja mantida semelhante, o treinamento físico impediu o prejuízo da capacidade oxidativa do TAB, o que pode favorecer a oxidação do ácido graxo ao invés do seu armazenamento no TAB. Finalmente, buscamos desvendar um possível mecanismo celular envolvido nessa resposta, e que seria, em última instância, responsável pela prevenção do diabetes tipo 2. Escolhemos a AMPK, por ser uma molécula chave para as respostas metabólicas em diferentes tecidos corporais.

Como demonstrado nos resultados, a quantidade proteica da AMPK total e p-AMPK (Thr 172) estavam reduzidas no grupo SED-CAF. Por outro lado, os grupos treinados apresentaram aumento da p-AMPK (Thr 172). Nosso dados corroboram o estudo de Gaidhu et al. (2009), no qual foi observado redução na quantidade proteica da AMPK e p-AMPK no tecido adiposo subcutâneo e visceral de animais alimentados com dieta hiperlipidica. Segundo os autores, a redução da AMPK e p-AMPK gera aumento da taxa lipolítica por inibir o efeito anti-lipolítico dessa proteína no TAB. Além disso, essa resposta parece contribuir para redução da capacidade oxidativa através da inibição do coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1-α) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR-α), e da redução da atividade da citrato sintase conforme observado no presente estudo. Por outro lado, o aumento da p-AMPK (Thr 172) nos animais TF-CAF foi fundamental para a manutenção da atividade oxidativa, conforme os dados obtidos de citrato sintase.

Um dos substratos da AMPK é a ACC, que quando fosforilada é inativada. A ACC cataliza a conversão do acetil CoA a malonil CoA na via lipogênica *de novo.* Já o malonil CoA é um potente inibidor da carnitina palmitoiltranferase 1 (CPT1), um passo limitante da entrada de ácido graxo para a oxidação mitocondrial. Quando a ACC está inativa, a produção do malonil CoA reduz e a inibição da CPT1 também, favorecendo a entrada de ácido graxo para a mitocôndria. No presente estudo, observamos redução da AMPK associada à redução da ACC (forma inativa) nos

animais SED-CAF, o que condiz com maior produção de malonil CoA, maior inibição da CPT1 e menor oxidação de lipídios na mitocôndria. Embora a ACC seja fundamental para a lipogênese *de novo*, nossos dados revelaram que a redução da forma inativa da ACC e aumento na produção de malonil CoA não foram suficientes para aumentar a lipogênese *de novo* nos animais SED-CAF.

Por outro lado, o treinamento físico impediu a redução da ACC no grupo TF-CAF, contribuindo para prevenção dos prejuízos oxidativos induzidos pela dieta de cafeteria. Dessa forma, a indução da fosforilação da AMPK e da ACC nos adipócitos é fundamental para a manutenção da oxidação lipídica dentro dessas células, garantindo que o excesso de lipídios proveniente da dieta e da lipólise seja desviado para processos de queima e não de síntese.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o conjunto de dados obtido no presente estudo permite afirmar que o treinamento físico aeróbio foi eficaz para a prevenção do diabetes tipo 2, e essa resposta foi associada à menor adiposidade corporal resultante do aumento da lipólise e da capacidade oxidativa do TAB induzido pela maior ativação via da AMPK/ACC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi F. et al. Relationship between obeisty, insulin resistence, and coronaty heart disease risk. **Journal of American College of Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 937-43, 2002.

Abel, E. D. et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, v. 409, n. 6821, p. 729-733, 2001.

AMERICAN COLLEGE OF SPORT MEDICINE. Appropriate physical activity intervetion strategies for weight loss and prevetion of weight regain for adults. **Official Journal of the American College of Sports Medicine**, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 33, suplemento 1, p. S62-69, 2010.

Algenstaedt P. et al. A new model of primary human adipocytes reveals reduced early insulin signalling in type 2 diabetes. **Horm Metab Res**, v. 36, n. 8, p. 531-7, 2004.

Alp P.R. et al. Activities of citrate synthase and NAD+-linked and NADP+-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.

Andersson U. et al. A low glycaemic diet improves oral glucose tolerance but has no effect on β-cell function in C57BL/6J mice. **Diabetes Obes Metab**, v. 12, n. 11, p. 976-82, 2010.

Anthony N.M; Gaidhu M.P.; Ceddia R.B. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. **Obesity (Silver Spring),** v. 17, n. 7, p. 1312-7, 2009.

Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 19, n. 4, p. 471-82, 2005.

Arner P. et al. Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 110-3, 2011.

Baena-Diez, J. et al. Impaired fasting glucose and risk of diabetes mellitus at 10 years. Cohort study. **Medicina clinica**, v. 136, n. 9, p. 382-385, 2011.

Balducci, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutritional Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 2009.

Bays, H.E. et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Rev. Cardiovasc. Ther,** v. 6, p. 343–368, 2008.

Bazin R.; Ferré P.Assays of lipogenic enzymes. **Methods Mol Biol**, v. 155, p. 121-7, 2001.

Benatti F.B. et al. Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. **Brazilian Journal of Medical Research**, v. 41, n. 10, p. 866-871, 2008.

Benito, M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. **Acta Physiologica**, v. 201, n. 3, p. 297-312, 2011.

Berggren, J.R.; Hulver M.W.; Houmard, J.A. Fat as an endocrine organ: influence of exercise. **Journal of Apply Physiology**, v. 99, p. 757–764, 2005.

Bernardis, L.L., Patterson, B.D. Correlation betwen “Lee Index” and carcass fat cotent in weanling and adult female rats with hipotalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, 1968.

Berndt, J. et al. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 7, p. 1472-1480, 2007.

Blüher M. et al. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 3110-5, 2007.

Blumenkrantz, M. Obesity: the world’s metabolic disorder. Beverly Hills, 1997. Disponível em < http:// www.quantumhcp.com,obesity.htm > Acesso em 23/09/2009.

Boeckner, L.S. et al. Differences in eating and activity behaviors, health history, and biomarkers among normal-weight, overweight, and obese rural midwestern hispanic women. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, n. 11, p. 1870-1874, 2006.

Bogan, J.S.; Kandror, K.V. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 4, p. 506-512, 2010.

Bonora, E. et al.Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin Endocrinol Metab**, v. 68, p. 374-378, 1989.

Boss O. et al. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. **FASEB Journal**, v. 12, p. 335-339, 1998.

Bouassida, A. et al. Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. **British Journal of Sport Medicine**, 2008.

Boudou P. et al. Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. **Eur J Endocrinol**, v. 149, n. 5, p. 421-4, 2003.

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.

Brandt, N. et al. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 2, p. E215-22, 2010.

Broeder C.E. et al. The effects of aerobic fitness on resting metabolic rate. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 55, p. 795-801, 1992.

Burén, J. et al. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 157-167, 2003.

Carvalho, E. et al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism,** v. 289, n. 4, p. E551-561, 2005.

Castell-Auví A. et al. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. **Br J Nutr**, v. 108, n. 7, p. 1155-62, 2012.

Cawthorn W.P.; Sethi J.K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 117-31, 2008.

Ceddia R.B. Composição corporal, taxa metabólica e exercício. **Rev Bras Fisiol Exerc**, v. 1, p. 143-56, 2002.

Chatzigeorgiou, A. et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-258, 2009.

Choi S.M. et al. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 21, p. 5009-20, 2010.

Chudyk, A.; Petrella, R.J. Effects of Exercise on Cardiovascular Risk Factors in Type 2 Diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 34, n. 5, p. 1228-1237, 2011.

Cinti S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. **Proc Nutr Soc**, v. 68, n. 4, p. 340-9, 2009.

Collins, S. et al. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 2, p. 243-248, 2004.

Cool B. et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Cell Metabolism**, v. 3, p. 403–416, 2006.

Cummings, B. P. et al. Subcutaneous administration of leptin normalizes fasting plasma glucose in obese type 2 diabetic UCD-T2DM rats. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 108, p. 14670–14675, 2011.

D'Angelo E. et al. Relationships between physical exercise practice, dietary behaviour and body composition in female university students. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 50, n. 3, p. 311-7, 2010.

Dastmalchi, M. et al. Effect of physical training on the proportion of slow-twitch type 1 muscle fibers, a novel nonimmune-mediated mechanism for muscle impairment in polymiositis or dermatomyositis. **Arthritis Rheumatism**, v. 57, n. 7, p. 1303-10, 2007.

Daval, M.; Foufelle, F.; Ferré, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. **The Journal of physiology**, v. 574, n. 1, p. 55-62, 2006.

De Filippis E. et al. Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 12, p. 4903-4910, 2006.

De Glisezinski, I. et al. Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue. **Journal of Physiology**, v. 587, p. 3393-404, 2009.

Delarue J.; Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 2, p. 142-8, 2007.

Di Girolamo, M. et al. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am J Physiol**. v.221, p.850-858, 1971.

Dimitriadis G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Res Clin Pract**, Suppl 1, p. S52-9, 2011.

Duncan R.E. et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 79-101, 2007.

Eguchi R. et al. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n. 3, p. 182-187, 2008.

Estadella, D. Efeitos da dieta de cafeteria e de ciclos alternados de dieta padrão com dieta de cafeteria sobre o metabolismo de ratos sedentários ou exercitados. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - **Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo, 2001.

Evangelista, F.S.; Krieger, J.E. Small gene effect and exercise-training induced cardiac hypertrophy in mice: an ACE gene dosage study. **Physiology Genomics**, v. 27, p. 231-6, 2006.

Ferreira, J.C.B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 760-765, 2007.

Fiebig, R.G. et al. Training down-regulates fatty acid synthase and body fat in obese Zucker rats. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 34, n.7, p. 1106-14, 2002.

Folli F. et al. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 92, n. 4, p. 1787-94, 1993.

Fonseca-Alaniz, M.H. et al. Tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

Friedewald W.T.; Levy R.I.; Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.

Friedman J.M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 3, p. 973S-979S, 2009.

Friedman, J.M. Leptin and the regulation of body weigh. **The Keio journal of medicine**, v. 60, n. 1, p. 1-9, 2011.

Fu Y. et al. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. **J Lipid Res**, v. 46, p.1369–1379, 2005.

Fujii N. et al. Ablation of AMP-Activated Protein Kinase-α2 Activity Exacerbates Insulin Resistance Induced by High-Fat Feeding of Mice. **Diabetes**, v. 57, p. 2958-2966, 2008.

Gaidhu M.P. et al. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. **J Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 704-15, 2009.

Gaidhu, M.P. et al. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 4, p. C961-971, 2010.

Gaidhu M.P; Ceddia R.B. The role of adenosine monophosphate kinase in remodeling white adipose tissue metabolism. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 39, n. 2, p. 102-8, 2011.

Garber, A.J. Obesity and type 2 diabetes: which patients are at risk? **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 5, p. 399-408, 2012.

Garton A.J. et al. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. **Eur J Biochem**, v. 179, n. 1, p. 249-54, 1989.

Gollisch, K.S.C. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism,** v. 297, p. E495-E504, 2009.

Gross, J.L. et al. Diabetes melitos: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

Guerra R.L. et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids Health Dis**, v. 6, p. 16, 2007

Hammarstedt A, Graham T.E, Kahn B.B. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. **Diabetol Metab Syndr,** v. 4, n. 1, p. 42, 2012.

Hansen D. et al. Continuous low- to moderate-intensity exercise training is as effective as moderate- to high-intensity exercise training at lowering blood HbA(1c) in obese type 2 diabetes patients. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1789-97, 2009.

Harada, K. et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.285, p. E1182-1195, 2003.

Helmrich S.P. et al. Physical activity and reduced occurrence of non–insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 325, n. 3, p. 147–152, 1991.

Heyne, A. et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addiction biology**, v. 14, n. 4, p. 373-383, 2009.

Higa T.S. et al. Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 10, p. 988-994, 2012.

Hirosumi J. et al. A central role fot JNK in obesity and insulin resistence. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-6, 2002.

Honnor R.C.; Dhillon G.S.; Londos C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. I. Cell preparation, manipulation, and predictability in behavior. **J Biol Chem**, v. 260, n. 28, p. 15122-9, 1985.

Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, p. 944–948, 2006.

Howard, J.K.; Flier, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 365–371, 2006.

Hu F.B. et al. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. **JAMA**, v. 282, n. 15, p. 1433–1439, 1999.

Huang S.; Czech M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab**, v. 5, n. 4, p. 237-52, 2007.

Hunter, G.R. et al. Exercise Training prevents regain of visceral fat for 1 year following weight loss. **Obesity (Silver Spring),** 2009.

Hussey, S.E. et al. Exercise training increases adipose tissue GLUT4 expression in patients with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes and impaired glucose tolerance global burden: Prevalence and projections, 2010 and 2030. **International**

Diabetes Federation. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance>. Acesso em: 10 mar. 2011.

Irving, B. A., et al. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 11, p. 1863-1872, 2008.

Isken F. et al. Impairment of fat oxidation under high- vs. low-glycemic index diet occurs before the development of an obese phenotype. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v., n. 2, p. E287-95, 2010

Islam, M.S.; Loots du, T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 249-261, 2009.

Jessen, N.; Goodyear, L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 99, n. 1, p. 330-337, 2005.

Jiang L. et al. Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e6884, 2009.

Jocken J.W.; Blaak E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. **Physiol Behav**, v. 94, n. 2, p. 219-30, 2008.

Kahn B.B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab**, v. 1, p. 15–25, 2005.

Kanasaki, K.; Koya, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 197636, 2011.

Kelley, G.A. et al. Aerobic exercise and resting blood pressure in older adults: a meta-analytic review of randomized controlled trials. **The journals of gerontology,** v. 56, n. 5, p. M298-303, 2001.

Kershaw, E.E.; Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

Kido, Y. et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 2, p. 199-205, 2000.

Kim, H.J. et al. Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance. **European journal of applied physiology**, v. 93, n. 3, p. 353-358, 2004.

Kim, S. et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 11, p. 1343-1351, 2011.

Kimura M. et al. Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. **Life Sci**, v. 79, n. 22, p. 2105-11, 2006.

Klimcakova E. et al. Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men. **Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 12, p. 5107-12, 2006.

Koh, H.J. et al. Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. **Biochemestry Journal**, v. 403, p. 473–48, 2007.

Kovacs, P. et al. A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene (FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1915-1919, 2004.

Kraemer, R.R.; Castracane, V.D. Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and adiponectin. **Experimental Biology Medicine**, v. 232, p. 184–194, 2007.

Krook A. et al. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 49, n. 2, p. 284-92, 2000.

Kumada M. et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, p. 85–89, 2003.

Kursawe R. et al. Downregulation of ADIPOQ and PPARγ2 gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with hepatic steatosis. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 10, p. 1911-7, 2010.

Langin, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **Comptes rendus biologies**, v. 329, n. 8, p. 598-607; discussion 653-595, 2006.

Larson-Meyer, D.E. et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. **Diabetes care**, v. 29, n. 6, p. 1337-1344, 2006.

Lee, I.S.; Shin, G; Choue, R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 1, p. 39-50, 2010.

Leick, L. et al. Endurance exrecise induces mRNA expression of oxidative enzymes in human skeletal muscle late in recovery. **Scand J Med Sci Sports**, 2009.

Lim S. et al. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol-binding protein-4 concentrations in young and middle-aged women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 6, p. 2263-8, 2008.

Lim, C.T. et al. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 87-97, 2010.

Lima-Silva, A.E. et al. Metabolismo de gordura duarante o exercício físico: mecanismos de regulação. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 8, n. 4, p. 106-114, 2006.

Livingstone, C.; M. Collison, M. Sex steroids and insulin resistance. **Clinical science,** v. 102, n. 2, p. 151-166, 2002.

Ljbicic, V. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenes in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. **Biochimstry Biophysical Acta**, v. 1800, n. 3, p. 223-234, 2010.

Lönn, M. et al. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. **FASEB Journal**, v. 24, n. 1, p. 326-31, 2010.

Lou Z. et al. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. **Trends Pharmacology Science**, v. 26, p. 69-76, 2005.

Lowndes, J. et al. Leptin responses to long-term cardiorespiratory exercise training without concomitant weight loss: a prospective study. **J Sports Med Phys Fitness**, v.48, n.3, p.391-7, 2008.

Malin S.K.; Kirwan J.P. Fasting hyperglycaemia blunts the reversal of impaired glucose tolerance after exercise training in obese older adults. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 9, p. 835-41, 2012.

Martins M.D.; Lima F.L.; Fonseca A. Relationship between leptin and body mass and metabolic syndrome in an adult population. **Rev Port Cardiol**. 2012. In press. Disponível em: <http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/eop/S0870-2551(12)00194-1.pdf>. Acesso em 30 set 2012.

Marwick T.H. et al. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 119, n. 25, p. 3244-62, 2009.

Miyazaki S. et al. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. **Life Sci**, v. 86, n. 17-18, p. 691-8, 2010.

Morrison, C.D. et al. Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 5, p. 409-416, 2009.

Munday M.R. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. **Biochem Soc Trans**, v. 30, n. 6, p. 1059-64, 2002.

Musi, N. et al. Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2045-2050, 2005.

Nassis, G.P. et al. Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. **Metabolism: clinical and experimental,** v. 54, n. 11, p. 1472-1479, 2005.

O'Neill H.M; Holloway G.P; Steinberg G.R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. **Mol Cell Endocrinol**, 2012. In press. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720712003334> Acesso em 10 ago 2012.

Oakes, N.D. et al. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1768-1774, 1997.

Ortega, F.J. et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 13-20, 2010.

Oswal, A.; Yeo, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity**, v. 18, n. 2, p. 221-229, 2010.

Pádua, M.F. et al. Exercício Físico Reduz a Hiperglicemia de Jejum em Camundongos Diabéticos Através da Ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina Esporte**, v. 15, p. 179-184, 2009.

Pandit R. et al. Dietary Factors Affect Food Reward and Motivation to Eat. **Obes Facts**, v. 5, n. 2, p. 221-242, 2012.

Pawlak D.B.; Kushner J.A.; Ludwing D.S. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homoeostasis, and plasma lipids in animals. **Lancet**, v. 364, p. 778–85, 2004.

Petridou, A. et al. Long-term exercise increases the DNA binding activity of peroxisome proliferator–activated receptor γ in rat adipose tissue. **Metabolism Clinical and Experimental.** v.56, p.1029–1036, 2007.

Phillips S.A; Kung J.T. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. **Curr Opin Pharmacol**, v. 10, n. 6, p. 676-83, 2010.

Poehlman E.T. A review: exercise and its influence on resting energy metabolism in man. **Med Sci Sports Exerc**, v. 21, n. 5, p. 515-25, 1989.

Punyadeera, C. et al. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 3, p. 427-436, 2005.

Randle P.J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes Metab Rev**, v. 14, n. 4, p. 263-83, 1998.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. i. effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J Biol Chem**, v. 239, p. 375-80, 1964.

Roden M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 92-6, 2004.

Rosen E.D.; Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, p. 847-853, 2006.

Ross, R.; Bradshaw, A.J. The future of obesity reduction: beyond weight loss. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 319-325, 2009.

Sakamoto K.; Holman G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E29-37, 2008.

Saltiel A.R.; Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

Sampey, B.P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

Samson S. L. et al. Exenatide decreases hepatic fibroblast growth factor 21 resistance in non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model of obesity and in a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 54, n. 12, p. 3093-3100, 2011.

Sanders M. et al. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. **Biochem J**, v. 403, p. 139-148, 2007.

Schrauwen, P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. **The Proceedings of the Nutrition Society,** v.66, n. 1, p. 33-41, 2007.

Schwenk R.W. et al. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. Prostaglandins **Leukot Essent Fatty Acids**, v. 82, n. 4-6, p. 149-54, 2010.

Scribner K.B et al. Long-term effects of dietary glycemic index on adiposity, energy metabolism, and physical activity in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 5, p. E1126-31, 2008.

Seo J.B. et al. Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. **J Biol Chem**, v. 279, n. 21, p. 22108-17, 2004.

Shankar, K. A. et al. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 153-164, 2010.

Shen W.J. et al. Mutational analysis of structural features of rat hormone-sensitive lipase. **Biochemistry**, v. 37, p. 8973– 8979, 1998.

Shi Y.; Cheng D. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 1, p. E10-8, 2009.

Shulman, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**, v. 106, p. 171-176, 2000.

Smith, U. et al. Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 892, p. 119-126, 1999.

Smith, U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 26, n. 7, p. 897-904, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Calcule o número de diabéticos na sua cidade. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/calculadoras/numero-de-diabeticos>. Acesso em: 10 mar. 2011.

Spinola A.V. et al. AMP-activated protein kinase response to aerobic exercise training prevents glucose intolerance induced by hypercaloric diet. **Experimental Biology**, Washington, Estados Unidos, 2011.

Spranger J. et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v. 361, p. 226–228, 2003.

Sriwijitkamol, A. et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 836-848, 2007.

Stumvoll M.; Goldstein B.J; van Haeften T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333-46, 2005.

Su C.L. et al. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 43615–43619, 2003.

Sztalryd C. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. **J Cell Biol**, v. 161, n. 6, p. 1093-1103, 2003.

Tabák, A.G. et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. **Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2215-21, 2009.

Takeuchi K.; Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 6, p. E1195-209, 2009.

Tappy L.; Binnert C.; Schneiter P.H. Energy expenditure, physical activity and body-weight control. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 663-666, 2003.

Towler M.C.; Hardie D.G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 328-41, 2007.

Trevisan M.C.; Burini R.C. Metabolismo de repouso de mulheres pos-menopausadas submetidas a programa de treinamento com pesos (hipertrofia). **Rev Bras Med Esporte,** v. 2, p. 133-137, 2007.

Turner, N. et al. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085-2092, 2007.

Umpierre, D. et al. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 17, p. 1790-1799, 2011.

Vaisy M. et al. Exercise-induced, but not creatine-induced, decrease in intramyocellular lipid content improves insulin sensitivity in rats. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 12, p. 1178-85, 2011.

van Schothorst E.M. et al. Effects of a high-fat, low- versus high-glycemic index diet: retardation of insulin resistance involves adipose tissue modulation. **FASEB J**, v. 23, n. 4, p. 1092-101, 2009.

Vieira V.J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, 2009.

Wakil S.J.; Stoops J.K.; Joshi V.C. Fatty acid synthesis and its regulation. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 537-79, 1983.

Walker, K. et al. Diet and exercise in the prevention of diabetes. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 23, n. 4, p. 344-352, 2010.

Wang H.; Eckel R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 2, p. E271-88, 2009.

Weyer C. et al. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, not obesity itself, predict type II diabetes independent of insulin resistance. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1498-506, 2000.

Whybrow S. et al. The effect of an incremental increase in exercise on appetite, eating behaviour and energy balance in lean men and women feeding ad libitum. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 1109-1115, 2008.

Williamson, D.A. et al. Impact of a weight management program on health-related quality of life in overweight adults with type 2 diabetes. **Archives of internal medicine**, v. 169, n. 2, p. 163-171, 2009.

Wilson, C. et al. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. **The Biochemical jornal,** v. 406, n. 3, p. 457-467, 2007.

Wu X. et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v. 52, p. 1355–1363, 2003.

Wueest S. et al. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 52, n. 3, p. 541-6, 2009.

Xita N.; Tsatsoulis A. Adiponectin in diabetes mellitus. **Curr Med Chem**, 2012. In press. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876922>. Acesso em: 26 set 2012.

Xu, X. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 5, p. R1115-1125, 2011.

Yamaguchi T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1288-1295, 2002.

Yang, J. et al. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27025-27029, 2009.

Yoon, M.J. et al. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor. **Diabetes***,* v. 55, p. 2562–2570, 2006.

You, T. et al. Addition of aerobic exercise to dietary weight loss preferentially reduces abdominal adipocyte size. **International journal of obesity**, v. 30, n. 8, p. 1211-1216, 2006.

Yu C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J Biol Chem, v. 277, n. 52, p. 50230-6, 2002.

Zeng, Q. et al. Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 5, p. 454-459, 2007.