ROGÉRIO ANTONIO LAURATO SERTIÉ

**REPERCUSSÕES DO DESTREINAMENTO FÍSICO SOBRE O
METABOLISMO E A CELULARIDADE DO TECIDO ADIPOSEO
BRANCO PERIEPIDIDIMAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

ROGÉRIO ANTONIO LAURATO SERTIÉ

**REPERCUSSÕES DO DESTREINAMENTO FÍSICO SOBRE O
METABOLISMO E A CELULARIDADE DO TECIDO ADIPOSEO
BRANCO PERIEPIDIDIMAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia
Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima

São Paulo

2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sertié, Rogério Antonio Laurato.

Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a
celularidade do tecido adiposo branco periepídimal de ratos /
Rogério Antonio Laurato Sertié. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Fabio Bessa Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de
concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do
tecido adiposo

Versão do título para o inglês: Physical detraining repercussions on
metabolism and cellularity of white adipose tissue periepidual in rats.

Descritores: 1. Exercício físico 2. Tecido adiposo 3. Lipogênese
4. Lipólise 5. Adipogênese I. Lima, Fabio Bessa II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB0142/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rogério Antonio Laurato Sertié.

Título da Tese: Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do tecido adiposo branco periepídídimo de ratos.

Orientador(a): Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Esta Tese eu dedico integralmente ao
meu pai, Jayme Antonio Aboin
Sertié, que neste ano nos deixou.

AGRADECIMENTOS

Tenho absoluta certeza que esta é uma das partes mais difíceis de todo este trabalho. Se eu resolvesse dedicar apenas uma linha de texto para agradecer a todos os que, de alguma forma, contribuíram positivamente para o meu desenvolvimento e formação do caráter acredito que esta tese teria seu volume aumentado em algumas dezenas de folhas. Exatamente pelo fato de serem muitas as pessoas que eu gostaria de agradecer então prefiro iniciar meus agradecimentos com um pedido de desculpas àqueles amigos (as) que não tiveram seus nomes citados. Para estes já deixo o meu mais profundo respeito e carinho.

Outra dificuldade em se iniciar os agradecimentos é que isto presume o final de um ciclo que se iniciou em 2001, quando ingressei no Mestrado aqui mesmo no Dept. de Fisiologia e Biofísica. Foram então 9 anos de desenvolvimento intelectual e também social, e perceber que isto está chegando ao final causa certa emoção. Porém, prefiro olhar de outra forma, prefiro entender que não é o final de um ciclo, mas sim o início de outro, agora por uma outra perspectiva, mas que será igualmente fascinante à vivida até hoje.

Como não poderia ser diferente quero agradecendo aos **meus pais**, Jayme Antonio Aboin Sertié (*in memoriam*) e Marli Laurato Sertié, duas pessoas fantásticas, que criaram a mim e minha irmã de forma ímpar e responsável, nos preparando para o mundo e as mudanças que nele aconteceriam.

À minha esposa **Sandra**, meu anjo, aquela em cuja companhia encontro paz e conforto e que aprendi a amar com a imensa intensidade de quem precisa respirar. Minha mulher, amiga, amante e companheira, que integralmente tem-se colocado ao meu lado.

Ao Prof. Dr. **Fábio Bessa Lima**, que de forma excepcional me orientou durante o doutorado, me ensinando a olhar a pesquisa de forma crítica e imparcial. Trata-se de um cientista por vocação, cujo pior dos resultados obtidos em laboratório, para ele, é uma grande

descoberta. Além disso, seu modo calmo e inteligente de resolver as dificuldades sempre transmitia muito segurança.

Agradeço também a todos os colegas de laboratório que já passaram por lá ou ainda permanecem. Esses colegas são muitos e os nomearei aqui da forma como nos chamávamos lá: **Sandra, Amanda, André, Ari, Arnaldo, Patrícia, Thalita, Léo, Natalie, Anderson, Miguel** e também à turminha transitória da iniciação científica.

A todos os docentes do departamento e do ICB que sempre se dispuseram a colaborar, quando possível.

Aos colegas de pós graduação que nestes longos anos de ICB sempre estiveram juntos nas disciplinas e congressos.

Ao José Maria Rodrigues Junior, secretário da pós graduação, pelo excelente profissionalismo com o qual sempre me recebeu, prestativo e exato em suas observações.

Também quero agradecer aos profissionais da Biblioteca do ICB, sem os quais esta tese não teria excelente formato.

Agradeço ao pessoal do Biotério por terem sempre me auxiliado quando solicitei, deixando as condições ideais para os animais.

Enfim, como a lista é grande e não quero me alongar, agradeço à vida, magnífica e esplendorosa, que se apresenta de forma fascinante a cada dia.

Não conheço nenhuma fórmula infalível para obter o sucesso,
mas conheço uma forma infalível de fracassar: tentar agradar a
todos

John F. Kennedy

RESUMO

SERTIE, R. A. L. **Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do tecido adiposo branco periepídídimal de ratos.** 114 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Todas as adaptações adquiridas através do treinamento físico são reversíveis durante a inatividade. Reduções significativas no consumo máximo de oxigênio (VO₂max) são observadas dentro de duas a quatro semanas de destreinamento. Por outro lado, as consequências do destreinamento sobre o tecido adiposo são pouco estudadas. O objetivo foi investigar os efeitos de destreinamento físico sobre o metabolismo e celularidade do tecido adiposo periepídídimal. Métodos e Resultados: Ratos Wistar machos, com idade de 6 semanas, foram divididos em 3 grupos: treinado (T) durante 12 semanas; destreinados (D), (treinados por 8 semanas e destreinados por 4 semanas), e sedentário (S) pareados por idade. O treinamento consistiu em sessões de esteira rolante (1h/dia, 5d/semk, 50 – 60% da capacidade máxima). A análise morfométrica do tecido PE revelou diferenças significativas entre os grupos. A área seccional dos adipócitos do grupo D foi significativamente maior que a T e S ($3474 \mu\text{m}^2 \pm 68,8 \mu\text{m}^2$ vs $1945,7 \mu\text{m}^2 \pm 45,6 \mu\text{m}^2$ vs $2492,4 \mu\text{m}^2 \pm 49,08 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Em comparação com as células dos animais do grupo T as células do D apresentaram 48% de aumento na capacidade de realizar a lipogênese, espontaneamente ou insulina estimulada. Já lipólise basal não se alterou. A redução de 15% na apoptose foi observada nos grupos T e D em relação ao S. Algumas expressões de genes foram alterados em D vs S: a adiponectina aumentou 3 vezes e PPAR-gama aumentou 2 vezes. O gene do Pref-1 foi 3 vezes maior em T vs S. Estes resultados sugerem fortemente que a adipogênese foi estimulada neste grupo. Conclusões: o destreinamento causa aumento significativo no tamanho dos adipócitos e na capacidade lipogênica. Como a apoptose celular na gordura PE

foi reduzida em D e T, estes resultados sugerem que as alterações do tecido adiposo após destreinamento podem ser potencialmente obesogênicas.

Palavras chave: Apoptose, Tecido adiposo, Lipogênese, Lipólise, Adipogênese.

ABSTRACT

SERTIE, R. A. L. **Physical detraining repercussions on metabolism and cellularity of white adipose tissue periepididymal in rats.** 114 f. Thesis (PhD Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

All adaptations acquired through physical training are reversible during inactivity. Significant reductions in maximal oxygen uptake (VO_{2Max}) are observed within two-four weeks of detraining. Conversely, the consequences of detraining on adipose tissue are poorly known. The objective was to investigate the physical detraining effects on metabolism and cellularity of rat periepididymal adipose tissue. Methods and Results: Male Wistar rats, ageing 6 weeks, were divided in 3 groups: trained (T) for 12 weeks; detrained (D), (trained for 8 weeks and detrained for 4 weeks), and age-matched sedentary (S). Training consisted in treadmill running sessions (1h/day, 5d/week, 50 – 60% of the maximal capacity). The morphometric analysis of PE tissue disclosed significant differences between the groups. The adipocyte sectional area of group D was significantly bigger than T and S ($3474 \mu m^2 \pm 68,8 \mu m^2$ vs $1945,7 \mu m^2 \pm 45,6 \mu m^2$ vs $2492,4 \mu m^2 \pm 49,08 \mu m^2$, respectively). Compared to T the cells of D animals showed 48% increased ability to perform: lipogenesis, either spontaneously or insulin stimulated and isoproterenol-stimulated lipolysis. Basal lipolysis did not change. A 15% reduction in apoptosis was observed in groups T and D in relation to S. Some gene expressions were changed in D vs S: adiponectin (3-fold up) and PPAR-gamma (2-fold up). PREF-1 gene was 3-fold higher in T vs S. These results strongly suggest that adipogenesis was stimulated in this group. Conclusions: Detraining causes significant increase in adipocyte size and lipogenic capacity. As PE fat cell apoptosis was reduced in D and T, these results suggest that adipose tissue changes following detraining can potentially be obesogenic.

Key words: Apoptosis, Adipose tissue, Lipogenesis, Lipolysis, Adipogenesis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 3.2 Protocolo de treinamento	33
3.3 Parâmetros avaliados durante o protocolo experimental	35
3.4 Sacrifício dos animais	35
3.5 Atividade da enzima Citrato Sintase (Cs)	35
3.6 Determinações bioquímicas e hormonais	36
3.6.1 Glicose	36
3.6.2 Insulina, Leptina e Testosterona	36
3.6.3 Ácidos Graxos Não Esterificados	36
3.6.4 Triacilgliceróis	36
3.6.5 Colesterol Total e suas frações	38
3.6.5.1 Colesterol Total	38
3.6.5.2 HDL-Colesterol	38
3.7 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica	39
3.8 Teste de captação de [³ H]-2DG em adipócitos isolados	40
3.9 Teste de Incorporação de D-[U- ¹⁴ C]-Glicose ou ¹⁴ C-Acetato em lipídeos e oxidação de D-[U- ¹⁴ C]-Glicose ou ¹⁴ C-Acetato até ¹⁴ CO ₂ em adipócitos isolados	41
3.10 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente ao estímulo com Isoproterenol	42
3.11 Análise da condensação de cromatina por microscopia de fluorescência	43
3.12 Avaliação da expressão gênica do PPAR γ , C/EBP α , ADD1/SREBP1C, β 2M, PREF1 e Adiponectina	43
3.12.1 Extração de RNA Total	44
3.12.2 Síntese de cDNA por Transcrição Reversa (RT)	46
3.12.3 Reação em Cadeia da Polimerase a partir de cDNA (RT-PCR convencional) estudo dos genes de interesse	46
3.12.3.1 PCR Convencional	46
3.12.3.2 Eletroforese do produto amplificado	47
3.12.4 PCR Real Time	48

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Efeito do treinamento físico aeróbio crônico sobre a atividade máxima da enzima Citrato Sintase	51
5.2 Efeito sobre o peso corporal	52
5.3 Análise da ingestão hídrica e do consumo de ração	54
5.3.1 Ingestão hídrica	54
5.3.2 Consumo alimentar	55
5.4 Glicemia, Insulinemia, Leptinemia e Testosteronemia	56
5.5 Triacilglicerol (TAG), Colesterol Total, HDL Colesterol, LDL Colesterol e NEFA	56
5.6 Peso do coxim adiposo peri-epididimal	57
5.7 Tamanho dos adipócitos da região peri-epididimal	58
5.8 Estudo das capacidades metabólicas de adipócitos isolados	59
5.8.1 Captação de 2-Desoxi-D-Glicose (2DG)	59
5.8.2 Oxidação da [U-¹⁴C]-Glicose até CO₂	60
5.8.3 Oxidação de ¹⁴C-Acetato até CO₂	61
5.8.4 Incorporação de [U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos	62
5.8.5 Incorporação de ¹⁴C-Acetato em lipídeos	63
5.8.6 Lipólise em adipócitos isolados	64
5.9 Estudo da celularidade	65
5.9.1 PCR Convencional	65
5.9.2 PCR Real Time	67
5.10 Análise da condensação de cromatina por microscopia de fluorescência	68
6 DISCUSSÃO	69
6.1 Repercussões gerais do treinamento e do destreinamento	71
6.1.1 Peso corporal e ingestão alimentar	71
6.1.2 Peso do coxim adiposo	74
6.2 Repercussões endócrinas e bioquímicas	75
6.3 Testes biológicos com adipócitos isolados	77
6.3.1 Captação de 2-Desoxi-Glicose (2DG)	77
6.3.2 Oxidação de D-[U-¹⁴C]-Glicose ou ¹⁴C-Acetato até ¹⁴CO₂ em adipócitos isolados	79
6.3.3 Incorporação de glicose e de acetato em lipídeos totais	80

6.4 Adipogênese: expressão gênica: PPARγ, C/EBPα e SREBP1/ADD1	81
6.5 Apoptose	85
7 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	100
ANEXO A - Padronização do PCR semi-quantitativo	100
ANEXO B - Padronização da reação de PCR-Real Time	104
ANEXO C - Determinação do gene constitutivo a ser utilizado para normalização das reações de PCR-Real Time	106
ANEXO D – Planilha de treinamento	107

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tecido adiposo (TA) é o maior reservatório de energia de que dispomos, sendo durante muito tempo considerado um tecido cuja finalidade era apenas esta. Na última década do século passado descobriu-se que, além de ser fonte abundante de energia, o TA era também um importante produtor de substâncias ativas, passando então a ser reconhecido como órgão endócrino, desempenhando um papel ativo na regulação do metabolismo energético (AHIMA; FLIER, 2000; FRUHBECK et al., 2001).

O interesse por seu estudo mais aprofundado se deveu, em parte, ao aumento epidêmico da obesidade nas mais diversas sociedades contemporâneas. Até pouco tempo atrás pouco se ouvia falar em obesidade. Em um intervalo de tempo entre os anos de 1930 e 1960 a grande vilã a ser combatida era a desnutrição. Os governos federal, estaduais e municipais despejavam grandes somas de dinheiro público no combate à desnutrição. Foram criados diversos programas sociais visando sua erradicação e a sociedade civil também se mobilizou formando organizações não governamentais sem fins lucrativos. Essa maciça mobilização, cujas Forças Armadas também faziam parte, surtiu efeitos bastante positivos, alcançando comunidades longínquas onde não apenas foram levados mantimentos, mas, sobretudo fez-se um trabalho educacional no sentido de ensinar às comunidades o manejo sustentável e a agricultura de subsistência. Foi um trabalho etnográfico e que resultou em excelente aumento de qualidade absoluta na alimentação das pessoas reduzindo significativamente a desnutrição no País.

Passada então a fase de combate ostensivo à desnutrição nos deparamos com algo bastante antagônico àquilo que víamos há algumas décadas. Hoje notamos que o quadro está invertido, onde já nem mais se ouve falar em desnutrição. Claro que, ainda em alguns rincões do Brasil e do mundo a falta de alimento acontece de forma importante, porém atualmente os gastos em saúde pública se tornaram infinitamente maiores quando nos referimos ao combate à

obesidade e as intercorrências que esta gera. A obesidade na atualidade pode ser considerada uma epidemia de proporções mundiais, afetando não apenas as sociedades mais ricas e desenvolvidas, mas também sociedades menos favorecidas. Um grande representante desta nova era global são os EUA, onde em 2003 a obesidade comprometia cerca de 24.5% da população, com taxas crescentes em 48 dos 50 estados americanos. Estimativas apontavam que aproximadamente 200 milhões de pessoas estariam acima do peso recomendado pelas sociedades médicas, projetando-se, a continuar este ritmo, o comprometimento de 73% dos adultos nos Estados Unidos com sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} \leq 30$) e obesidade ($\text{IMC} > 30$) em 2012 (STEIN; COLDITZ, 2004).

No entanto a prerrogativa de ser uma sociedade obesa não pertence apenas aos norte-americanos. Outras sociedades também evoluíram em magnitude e proporções semelhantes, incluindo nesta lista o Brasil, onde em 2003 o excesso de peso afetava mais de 40% dos homens e mulheres, sendo que a obesidade efetiva afetava 9% dos homens e 13% das mulheres adultas do País. A frequência do excesso de peso na população brasileira supera em oito vezes o déficit de peso entre as mulheres e em quinze vezes o da população masculina. Num universo de 95,5 milhões de pessoas de 20 anos ou mais de idade há 3,8 milhões de pessoas (4,0%) com déficit de peso e 38,8 milhões (40,6%) com excesso de peso, das quais 10,5 milhões são consideradas obesas. Esse padrão se reproduz, com poucas variações, na maioria dos grupos populacionais analisados no País. Esses resultados fazem parte da 2ª etapa da Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 do IBGE, cujos capítulos sobre a composição da dieta alimentar e do estado nutricional foram feitos em parceria com o Ministério da Saúde. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2003).

O excesso de peso tende a aumentar com a idade, de modo mais rápido para os homens e, de modo mais lento, porém mais prolongado, para as mulheres. A partir dos 55 anos para os

homens e dos 65 para as mulheres observa-se que o excesso de peso tende a cair. Dos 20 aos 44 anos o excesso de peso é mais freqüente em homens, invertendo-se a situação nas faixas etárias mais altas.

No Brasil, entre os homens, o excesso de peso se verifica em dois patamares claros: em torno de 34% no Norte e Nordeste e entre 44 e 46% nas demais regiões. Comportamento similar se verifica nas áreas urbanas. Nas áreas rurais, o excesso de peso aparece em proporções menores, sendo 21% no Nordeste, atingindo 40% no Sul, ficando entre 28 e 34% nas demais regiões rurais. No caso das mulheres, esta diferenciação entre os meios urbano e rural não ocorre com a mesma intensidade, mas a presença de excesso de peso é sempre maior no meio rural. A exceção é o Nordeste, onde a participação no urbano é maior (39,4% contra 36,8%). Entre os homens obesos, as proporções são muito menores no Brasil rural (5,1%) do que no Brasil urbano (9,7%). Na população feminina os dados giram em torno de 13,2% no urbano e 12,7% no rural. Considerando-se os obesos de um modo geral, o percentual mais alto foi o das mulheres que vivem na área rural da região Sul (18,6%), enquanto o menor foi o dos homens do Nordeste rural (3,2%).

O excesso de gordura corporal, além de ser um importante fator de risco para diversas doenças, prejudica o desempenho físico, pois limita os movimentos e induz à fadiga precoce devido à sobrecarga que impõe ao organismo e às restrições respiratórias. A obesidade, por co-existir com outros fatores como hipertensão, dislipidemias e diabetes mellitus, vem sendo considerada fator de risco cardiovascular. Torna-se importante reforçar a máxima de que tanto o excesso de peso quanto a obesidade não detém a capacidade de promover nenhum tipo de adaptação positiva para a fisiologia do corpo animal. Não é correto afirmar que todo excesso de peso e/ou obesidade trarão repercussões negativas ao indivíduo, mas podemos afirmar com absoluta certeza que efeitos positivos não ocorrerão.

A prevenção e o tratamento da obesidade é algo que vem se demonstrando complexo. Inicialmente acreditava-se que bastava equilibrar a ingestão calórica com o dispêndio energético que o indivíduo conseguiria manter um peso próximo àquele predito como ideal. O excesso de ingestão calórica, por criar um balanço energético positivo, leva ao acúmulo de peso e, se progredir, à obesidade. No entanto, o passar dos anos nos revelou que o combate ou prevenção à obesidade é algo que envolve diversas variáveis que transitam desde aspectos psicológicos, passando pelos afetivos e indo até a dimensão fisiopatológica. Hoje é sabido que o obeso é um paciente multidisciplinar aonde somente intervenções vindas das várias áreas do conhecimento e agindo sinergisticamente são capazes de alcançar resultados realmente efetivos no tratamento. Em adição, evidências sugerem que grande parte da obesidade resulta mais do baixo gasto calórico que do alto consumo de comida, em que a inatividade física da vida moderna parece ser o maior fator etiológico do crescimento dessa doença nas sociedades industrializadas. Estudos epidemiológicos e de coorte têm demonstrado forte associação entre obesidade e inatividade física assim como tem sido relatada associação inversa entre atividade física, índice de massa corpórea e circunferência da cintura. Esses estudos demonstram que os benefícios do exercício físico sobre a obesidade podem ser alcançados com intensidade baixa, moderada ou alta, indicando que a manutenção de um estilo de vida ativo, independentemente de qual atividade é praticada, pode evitar o desenvolvimento da obesidade (GUSTA et al., 2003; LAKKA et al., 2002).

Acreditava-se, há alguns anos atrás, que o excesso de peso era responsável pelo aumento direto de co-morbidades cardiovasculares associadas à obesidade. Nos últimos anos, entretanto, esse conceito vem sendo extensivamente modificado. Portanto, não mais a porcentagem de gordura corporal total é tida como parâmetro para determinar o grau de obesidade e o risco que o indivíduo está exposto, mas sim a distribuição do tecido adiposo tem sido considerada o mais

importante fator relacionado ao aumento de distúrbios metabólicos e de eventos cardiovasculares (GODOY et al., 2006). Por exemplo, a gordura periférica tem características opostas à gordura visceral, pois é composta de adipócitos pequenos, mais proliferativos, com maior capacidade de armazenamento de ácidos graxos (AGLs), mais sensíveis à insulina e menos lipolíticos. Por fim, em indivíduos com aumento de gordura periférica, a liberação de AGLs ocorre predominantemente na circulação periférica, sendo o fígado poupado dos seus efeitos diretos (ECKEL et al., 2005).

Já a gordura visceral apresenta características metabólicas e celulares distintas. A crescente preocupação com o tecido adiposo visceral tem levado ao aparecimento de pesquisas demonstrando diretamente o efeito dessa *gordura ruim* como fator determinante de hipertensão arterial (HA), resistência insulínica e dislipidemia. Por outro lado, já existem evidências de que o tecido adiposo periférico pode funcionar como protetor dessas alterações. Portanto, mais do que simplesmente obesos, é possível encontrar indivíduos com peso normal que, devido ao aumento da circunferência da cintura, apresentam alterações metabólicas mais importantes do que grandes obesos.

O limite de peso corporal é uma medida arbitrária, sujeita à intervenção de uma série de fatores. Existem diferentes metodologias que auxiliam no diagnóstico da obesidade, sendo a maioria delas consideradas indiretas. A mais comum é o IMC (índice de massa corporal), que é calculado dividindo-se o peso (em kg) pelo quadrado da altura (em m), sendo o resultado analisado segundo a tabela 1.

Tabela 1 – Índice de massa corporal

Kg/m²	Mulher	Homem
Abaixo do peso	Abaixo de 19	Abaixo de 20
Normal	19 a 23,9	20 a 24,9
Obesidade leve	24 a 28,9	25 a 29,9
Obesidade moderada	29 a 38,9	39 a 39,9
Obesidade grave ou mórbida	Acima de 39	Acima de 40

Fonte: Organização Mundial da Saúde

Além do IMC, há também a relação cintura / quadril, definida através da divisão do maior perímetro abdominal entre a última costela e a crista ilíaca pelo perímetro dos quadris, que é definido como sendo a maior circunferência no nível dos trocânteres femorais. Índices superiores a 0,8 em mulheres e 0,9 em homens definem acúmulo central de gordura e estatisticamente se correlacionam com maior quantidade de gordura visceral ou portal medidas por métodos de imagem, como tomografia ou ressonância magnética. Sabe-se que a gordura central implica em maiores riscos para o sistema cardiovascular e também correlaciona-se positivamente com o surgimento de dislipidemias e síndromes metabólicas.

Mais recentemente a medida isolada da circunferência da cintura tem mostrado ser suficiente para estabelecer risco, sendo considerados os limites normais valores < 95 cm (para homens) e < 80 cm (para mulheres). O risco coronariano aumenta substancialmente quando a medida ultrapassa 104 cm em homens e 88 cm em mulheres. Talvez esta tenha sido uma das grandes mudanças nos critérios diagnósticos da obesidade e seus fatores de risco. Dessa forma, podem existir indivíduos não obesos ou sem excesso de peso, mas com a circunferência da cintura bastante aumentada, o que os classificaria dentro do grupo de risco. Portanto, mais do que tratar a obesidade, o simples excesso de gordura, mais especificadamente gordura abdominal, precisa ser tratado.

Muitos autores têm relacionado corretamente a hipertrofia adiposa como causa da obesidade, no entanto, um número menor de pesquisadores vêm estudando a hiperplasia adiposa como causa da obesidade.

Sabe-se que a hiperplasia adiposa é consequência de um balanço entre o processo de adipogênese e apoptose, e estes correlacionam-se positivamente com o ganho ou perda de massa gorda. Em determinadas fases da vida a adipogênese encontra-se mais ativa. Estudos morfológicos em embriões humanos, porcos e murinos, mostraram que a adipogênese se inicia antes do nascimento. A cronologia do aparecimento do tecido adiposo é estritamente dependente da espécie e do depósito adiposo sob consideração (DENOYERS et al., 1977). Durante a puberdade, o processo de formação de novas células de gordura encontra-se mais ativo e esta atividade se acentua novamente por volta dos 40-45 anos de idade. É importante salientar que a adipogênese é um processo que ocorre durante toda a vida, ou seja, a todo instante novos adipócitos estão sendo formados, enquanto os adipócitos mais “velhos” vão morrendo e sendo retirados do tecido (*turnover* do tecido adiposo). Estima-se, em seres humanos, que esta renovação ocorra em um intervalo entre 3 a 10 anos. Sabe-se ainda que o envelhecimento é um processo caracterizado pelo declínio funcional de muitos órgãos e tecidos, incluindo o tecido adiposo branco (TAB), que se reduz em indivíduos idosos, incluindo queda na capacidade de pré-adipócitos em se diferenciar e acumular lipídeos (KIRKLAND et al., 1994).

Mudanças no número de adipócitos ocorrem mediante um complexo arranjo de eventos que envolvem proliferação e diferenciação de pré-adipócitos. A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado. Fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o *receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas* (PPAR γ), a *proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis* (SREBP-1c) e as *proteínas ligantes ao amplificador CCAAT*

(CCAAT/enhancer binding protein C/EBPs) desempenham um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese, sendo o PPAR γ o fator transcricional mais importante e que mais caracteriza tal evento. Sinais hormonais e nutricionais afetam a diferenciação do adipócito de maneira positiva e negativa, e componentes envolvidos na interação célula-célula ou na matriz celular também são importantes na regulação do processo de diferenciação (NTAMBI; KIM, 2000).

O processo de adipogênese, basicamente, caracteriza-se pela conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros, evento que tem sido descrito com bastante regularidade em vários modelos experimentais que utilizam roedores e que, quando exacerbado, conduz à hiperplasia adiposa relacionando-se diretamente com o surgimento da obesidade (GREGOIRE et al., 1998; SHEPHERD et al., 1993). Estima-se que aproximadamente 30% do total de células presentes no TA sejam pré-adipócitos, ou seja, células comprometidas em se diferenciar para adipócitos maduros, assumindo características fisiológicas e morfológicas específicas.

Os estudos da adipogênese, na sua maioria, se realizam em culturas de células. Vários modelos de culturas de células, incluindo linhagens de pré-adipócitos e cultura primária de adipócitos têm sido utilizados no estudo dos eventos moleculares e celulares que ocorrem durante o processo de diferenciação dos pré-adipócitos, onde algumas das etapas assim como seus componentes já estão descritos na literatura (GREGOIRE et al., 1998).

Para que ocorra o início do processo de adipogênese, os pré-adipócitos devem parar de se multiplicar (growth arrest). O processo de diferenciação altera o formato da célula que assume paulatinamente uma forma esférica. As modificações morfológicas são paralelas a alterações nos componentes da matriz extracelular e de componentes do citoesqueleto (GREGOIRE et al., 1998). Recentes achados indicam que esses eventos são a chave para a regulação da adipogênese,

uma vez que eles podem promover a expressão de fatores de transcrição adipogênicos, como C/EBP α e PPAR γ (SELVARAJAN et al., 2001).

Existem descritas na literatura três isoformas do C/EBP (α , β e δ), sendo as três altamente expressas no adipócito e caracterizam-se por serem induzidas durante a adipogênese (CAO et al., 1991). O C/EBP α tem um papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e atua na conversão de fibroblastos em adipócitos. Adicionalmente, o C/EBP β pode também induzir a diferenciação do adipócito, provavelmente por induzir a expressão do PPAR γ (NU et al., 1995).

O PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama) é um fator de transcrição altamente expresso no tecido adiposo, onde apresenta forte capacidade de induzir a ativação transcricional de vários genes do adipócito, assim como induzir os passos iniciais da adipogênese. É pertencente à superfamília de receptores nucleares hormonais. Existem descritas na literatura duas isoformas de PPAR γ : PPAR γ 1 e 2. O PPAR γ 1 está presente no tecido adiposo e em menor nível em uma variedade de outros tipos celulares (macrófagos, epitélio do cólon, etc). O PPAR γ 2 é a isoforma mais dominante e exclusiva do tecido adiposo. (TONTONNOZ et al., 1994).

A proteína SREBP é um fator de transcrição que foi clonado originalmente do tecido adiposo de rato. Caracteriza-se por ser do tipo hélice-alça-hélice básico (bHLH) (MAGANA et al., 2000). Existe duas isoformas de SREBPs descritas na literatura: SREBP1 e o SREBP2. Ainda, duas isoformas variantes do SREBP1 foram descritas: SREBP1a e SREBP1c. O fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1) é um fator homólogo à isoforma SREBP1c de humanos (TONTONNOZ et al., 1993). Em experimentos realizados *in vitro*, o ADD1/SREBP1c aumentou a atividade transcricional do PPAR γ , elevando a proporção de células

submetidas ao processo de diferenciação (KIM et al., 1998). Em relação ao SREBP2 seu principal papel relaciona-se ao controle da biossíntese do colesterol (BROWN et al., 1999).

Em adição aos fatores de transcrição supracitados, alguns outros, como GATA-2 e GATA-3 (*GATA-binding transcription factors*) e CREB (*cAMP response element binding protein*) apresentam um papel crucial no controle molecular da transição pré-adipócito-adipócito (REUSCH et al, 2000; TONG et al, 2000). GATA-2 e GATA-3 são especificamente expressos nos pré-adipócitos brancos e o conteúdo de seu mRNA encontra-se reduzido durante a diferenciação dos adipócitos. A expressão constitutiva de GATA-2 e GATA-3 suprime a diferenciação dos adipócitos, mantendo as células quiescentes no estágio de pré-adipócito (TONG et al., 2000).

Outro fator de transcrição é o Foxo 1 (*forkhead transcription factor*). Como já citado, para que haja o início do processo de adipogênese é necessário que os pré-adipócitos parem de se multiplicar (*growth arrest*). Nakae et al. (2003) observou que o Foxo 1 está diretamente relacionado com a parada da multiplicação dos pré-adipócitos, sendo um fator de transcrição importante nos primeiros estágios da adipogênese.

Preadipocyte factor-1 (Pref-1), um membro da família *EGF-like protein* (fator de crescimento epidermal), foi identificado durante a diferenciação dos pré-adipócitos. Múltiplas isoformas foram clonadas, todas elas com peso molecular entre 45-60 kd. Sua expressão é bastante reduzida durante a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos. A expressão constitutiva do Pref-1 nos pré-adipócitos é responsável por inibir o processo de adipogênese. Sendo assim, a redução da expressão de Pref-1 no tecido adiposo correlaciona-se positivamente com o aumento do processo de adipogênese (SAMS; SUL, 1993).

Durante a fase terminal da diferenciação, a ativação de uma cascata transcricional leva ao aumento do conteúdo de mRNA das enzimas envolvidas na síntese e degradação de

triacilglicerol. Transportadores de glicose e receptores de insulina também aumentam nesta última fase. Além disso, a produção de leptina, resistina e TNF- α aumentam correlatamente ao aumento do número e tamanho de células adiposas, enquanto a adiponectina reduz com o aumento do TA.

Morfológicamente o tecido adiposo é constituído de uma quantidade variada de células como, pré-adipócitos, macrófagos, fibroblastos e adipócitos, sendo essas últimas, as únicas células do nosso organismo com capacidade de estocar gordura.

O papel primário do adipócito, cujo diâmetro pode variar entre 20 a 200 μm , é estocar gordura na forma de triacilglicerol durante períodos em que a oferta de calorias excede o gasto energético, liberando-o quando o gasto energético exceder a oferta. Esta capacidade advém do complexo enzimático e de proteínas regulatórias que ele possui e que se incumbem de realizar dois processos cruciais para a manutenção do metabolismo energético: lipogênese e lipólise (FRUHBECK et al., 2001). Para regular estes dois processos, o TA é alvo de uma grande quantidade de hormônios, entre eles, hormônio do crescimento GH, hormônios da tireóide, catecolaminas, glucagon, insulina e muitos outros, sendo a melatonina uma das mais recentes descoberta (ALONSO-VALE et al., 2005)

Com a descoberta da Leptina (Lep) em 1994 por Zhang, o tecido adiposo assumiu um status de órgão endócrino. Em adição a leptina, outras citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a resistina, a adiponectina (Adp), o angiotensinogênio, a adiposina e outros foram identificados como sendo proteínas secretadas pelo tecido adiposo, sendo chamadas de adipocinas.

As adipocinas desempenham numerosas funções: regulação da saciedade, do metabolismo de carboidratos e de lipídeos e da sensibilidade à insulina, sendo diferentemente expressas em

anomalias como diabetes mellitus e obesidade (BERGGREN et al., 2005). Muitas adipocinas interferem diretamente na sinalização da insulina, sendo a sua regulação importante para o entendimento da sensibilidade insulínica, obesidade e diabetes, uma vez que alteram ou influenciam o metabolismo dos carboidratos e lipídeos (MOLLER et al., 2004).

O fato de o exercício físico apresentar uma potente ação sobre o TA nos remete a pensarmos que seus efeitos afetem diretamente a síntese e secreção das adipocinas. Em pesquisas recentes observou-se que o exercício físico interfere na secreção das adipocinas, particularmente da IL-6, que tem sua concentração plasmática aumentada. Já está documentado que o exercício físico agudo aumenta os níveis plasmáticos de IL-6 (DRENTH et al., 1995; OSTROWSKI et al., 1998). Após 1h de exercício aeróbio (bicicleta) numa intensidade de 60% $\text{VO}_2 \text{ máx}$ o tecido subcutâneo abdominal aumentou a produção de IL-6. Tal produção começou 30 min após o início da atividade e estendeu-se até 3h após seu término (LYNGSO et al., 2002).

No que tange à Adp, essa não sofre influência direta do treinamento físico (HULVER et al., 2003). O mesmo ocorre com a Lep, onde o exercício físico agudo de curta duração não altera sua concentração plasmática (HOUMARD et al., 2000). Contudo, o exercício físico aeróbio de longa duração reduz a Lep circulante, mas geralmente isto se dá com a redução da massa gorda total (KOHRT et al., 1996). Resultados semelhantes foram observados por Lyngso et al. (2002) a respeito do $\text{TNF-}\alpha$, cujas flutuações encontradas foram sempre acompanhadas de alterações na composição corporal, mais precisamente no tecido adiposo.

Por ser um centro metabólico importante não nos surpreende o fato de que o TA esteja envolvido em adaptações tanto a eventos endógenos ou exógenos. Dentre os fatores endógenos podemos citar os hormônios, cujo TA apresenta capacidade de expressar receptores para uma infinidade dessas substâncias ativas. Já entre os fatores exógenos que são capazes de

provocar alterações adaptativas no TA está, como sabemos, o exercício físico, cuja repercussão geral é aumentar a taxa de mobilização e oxidação de triacilgliceróis gerando redução da massa gorda e, conseqüentemente, perda de peso.

Um programa de treinamento físico periodizado e organizado tem por objetivo desequilibrar a homeostase orgânica provocando adaptações que são dependentes da intensidade, duração e frequência das sessões de treino, assim como do grau de aptidão física e de determinantes genéticos individuais (JEFFREY; KLEIN, 2000).

Diversos são os órgãos e sistemas que sofrem adaptações ao exercício físico. A Educação Física, hoje constituída como área do conhecimento humano e produtora de inúmeros trabalhos acadêmicos, desenvolveu diferentes tipos de treinamentos físicos, sendo a utilidade de cada um atrelada diretamente à capacidade motora que se tem por objetivo desenvolver. Assim, quando o objetivo a ser alcançado é a quebra da homeostase presente no TA o melhor tipo de exercício a ser aplicado é o aeróbio de moderada intensidade. No entanto, esse tipo de treinamento gera adaptações, por exemplo, também no sistema cardiovascular, como o aumento do débito cardíaco máximo, aumento do número e calibre dos capilares sanguíneos, hipertrofia cardíaca excêntrica entre outras (VITUG et al., 1988). Entretanto, as adaptações também ocorrem sobre os sistemas endócrino, nervoso e muscular.

Os exercícios físicos aeróbios têm um importante efeito lipolítico, aumentando a mobilização de ácidos graxos para suprir a demanda aumentada de energia. Embora os efeitos do exercício sobre o metabolismo do tecido adiposo sejam bastante estudados, outras possíveis repercussões permanecem inexploradas, como é caso da influência do treinamento sobre celularidade do tecido. Ainda, menos estudadas são as readaptações sofridas pelo TA durante o processo de destreinamento. Alguns indícios de que possa haver alguma modificação advém de observações de que atletas, talvez por terem sido pessoas fisicamente ativas, ao se retirarem desta

atividade (destreinamento) tendem a um ganho de peso superior à média da sua idade, não sendo raros os casos de ex-atletas que desenvolveram obesidade estando, a partir de então, sujeitos a apresentarem todos os malefícios que a acompanham (PETIBOIS et al., 2004; SHEPARD et al., 2001). Seria este ganho de peso resultado apenas de um inadequado hábito alimentar, ou tal ganho está relacionado também com o aumento do número absoluto de adipócitos (hiperplasia), como resultado da ativação do processo de adipogênese associado ou não a uma redução da morte celular? Por destreinamento físico entendemos ser a interrupção de um programa de treinamento físico ou interrupção da prática regular de exercícios físicos que leva à perda das adaptações fisiológicas adquiridas durante o período de treinamento (WEINECK, 1999).

Inerente aos benefícios adquiridos com o treinamento físico (princípio da adaptação) está o princípio da reversibilidade, o qual mostra que quando o treinamento físico é suspenso ou reduzido (destreinamento físico) os sistemas corporais se reajustam de acordo com a diminuição do estímulo, até que a interrupção total dos exercícios faz com que o indivíduo retorne à condição geneticamente determinada. Desta forma, o destreinamento físico resulta em perda das adaptações cardiovasculares e metabólicas adquiridas, por exemplo, com o treinamento físico aeróbico de longa duração (COYLE, 1994).

Os livros e artigos publicados que fazem referências ao estudo do destreinamento físico o caracterizam por ser fisiologicamente programado. À medida em que o exercício físico é diminuído as adaptações fisiológicas obtidas diminuem na mesma magnitude até que a interrupção total do estímulo faz com que o indivíduo retorne à uma condição que lhe é geneticamente determinada. Nenhum tipo de estudo evidenciou que o processo de destreinamento físico faça com que haja uma piora dos sistemas orgânicos constituintes. Assim, um cardiopata que ganha condição cardiorrespiratória através de um programa de treinamento aeróbico ao interromper este programa (destreinamento físico) nada indica que ele ficará com uma

cardiopatia mais severa quando comparada à do início dos exercícios. O mesmo podemos dizer quando falamos de algumas doenças metabólicas, como o diabetes mellitus. Sabe-se que o exercício físico programado exerce uma importante melhora nos níveis glicêmicos de pacientes através da captação não insulino-dependente de glicose. Além disso, há melhora significativa na sensibilidade à insulina, o que torna o metabolismo da glicose muito mais controlado nesse tipo de patologia. Ao interromper os exercícios físicos o paciente apresentará uma piora no metabolismo da glicose, mas nada indica que ele ficará pior do que estava quando comparado ao início dos exercícios.

O destreinamento físico acarreta em perda das adaptações do sistema cardiovascular (centrais) e metabólicas do músculo esquelético (periféricas) adquiridas com o treinamento físico aeróbio, resultando na diminuição do VO_{2max} . Os efeitos do destreinamento sobre as adaptações centrais adquiridas com o treinamento físico estão diretamente relacionados ao débito cardíaco, o qual sofre modificações em função da readaptação da frequência cardíaca e do volume sistólico. Convertino (1997) mostrou que após 21 dias de destreinamento o débito cardíaco máximo reduz aproximadamente 26%, passando de 20 l.min^{-1} para $14,8 \text{ l.min}^{-1}$. Apesar da frequência cardíaca máxima ter sofrido um pequeno aumento de 193 bpm para 197 bpm após o destreinamento, a redução do volume sistólico de 104 para 74 ml não foi suficientemente compensada, e acarretou portanto, na redução do débito cardíaco máximo. Com isso há prejuízo na função cardíaca (perfusão de órgãos e sistemas) e consequentemente perda de condição aeróbia.

O sistema muscular é outro que também sofre diretamente com o destreinamento físico e cujas perdas já estão largamente descritas. Corredores de longa distância altamente treinados apresentaram densidade capilar reduzida (capilares por mm^2 de tecido muscular) após 15 dias de destreinamento (SALTIN; ROWELL, et al., 1980). Já Coyle et al. (1984) mostraram que no período compreendido entre a terceira a oitava semanas iniciais de destreinamento físico há uma

grande redução da atividade das enzimas oxidativas (succinato desidrogenase e citocromo oxidase), mas estas ainda permaneciam 50% acima dos níveis controle durante 12 semanas. Mas não só o metabolismo aeróbio é alterado com o destreino. A interrupção da prática regular de exercícios físicos causa também redução da quantidade absoluta de proteínas musculares, principalmente as contráteis (actina e miosina), reduzindo assim o desempenho geral daquela estrutura.

Entretanto poucas informações foram produzidas até então referentes aos efeitos do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do TA, ainda, encontramos na literatura muitas controversas a respeito desse tema, sugerindo que os estudos sobre esta relação estão se iniciando. Yasari et al. (2006) observaram aumento nas gorduras retroperitoneal, urogenital e mesentérica em ratas Sprague–Dawley que foram submetidas a 4 semanas de destreino após 8 semanas de exercício em esteira rolante, com ou sem dieta hiper lipídica. Resultado semelhante obteve Gutin (1999) que observou incremento de massa gorda após um período de destreinamento em crianças obesas. Neste estudo 76 crianças obesas foram submetidas a 4 meses de exercícios e posteriormente 4 meses de destreinamento físico. O destreinamento físico correlacionou-se positivamente com o aumento da gordura visceral e fatores de risco cardíaco (dislipidemias, etc). Já Braga (2004) comparou ratos submetidos a 8 semanas de destreinamento após 10 semanas de exercício físico e não observaram diferenças significativas tanto no peso corporal como na gordura da carcaça, quando comparados a ratos sedentários. Ainda, alguns estudos demonstraram que indivíduos fisicamente ativos tendem a apresentar menor quantidade absoluta de adipócitos maduros quando comparados a sedentários (OSCAI et al.,1972; ASKEW et al., 1975). Entende-se, então, que o destreinamento físico devolve o indivíduo a uma condição geneticamente determinada. No entanto, quando pensamos nos efeitos do destreinamento físico sobre o T.A. essa máxima pode não ser verdadeira. Será que

o *principio da reversibilidade* serve também para o T.A.? Há influência no processo de adipogênese ou apenas no metabolismo do tecido?

2 OBJETIVOS

1. Verificar a influência do treinamento físico aeróbio e do destreinamento físico sobre o processo de adipogênese na gordura periepididimal (PE).
2. Verificar se, além da diferenciação de adipócitos, há modificações no metabolismo dos adipócitos, principalmente no que tange a dois processos fundamentais: lipólise e lipogênese.
3. Estudar as repercussões do treinamento físico aeróbio e do destreinamento físico sobre o processo de apoptose celular na gordura PE

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos da cepa Wistar, com 6 semanas de vida, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram devidamente acondicionados sob condições padronizadas de temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e ciclo invertido de claro/escuro (12/12 horas por dia). Água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do ICB, sob o número 045 (fls 31, livro 2).

3.2 Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento consistiu de corrida em esteira rolante (IMBRAMED modelo KT3000), numa intensidade de 50 – 60% da capacidade máxima do animal. Os animais foram divididos em 3 grupos, sendo: grupo sedentário (S), grupo treinado (T) e o grupo destreinado (D). O grupo T foi submetido a um treinamento de 60 min diários, cinco vezes por semana, durante 12 semanas, de acordo com o protocolo estabelecido por Borges Silva (2005) e adaptado para a duração de 12 semanas. O grupo D foi submetido a um treinamento de 60 min diários, cinco vezes por semana, durante 8 semanas, sendo então submetido ao destreinamento físico por mais 4 semanas. Por fim, o grupo controle, ou seja, o grupo S, que não realizou nenhum tipo de treinamento durante as 12 semanas do protocolo experimental.

Importante ressaltar neste momento que, até a oitava semana do protocolo experimental, os grupos T e D formavam um único grupo, uma vez que foram submetidos ao mesmo programa de treinamento durante este período. Somente após a 9ª semana é que o grupo D passou a existir, formando-se os três grupos.

Cada grupo experimental era constituído de 15 animais que, ao final de 12 semanas, formavam 3 grupos de 5 animais cada. Ocorre que nem todos os animais que são colocados na esteira rolante apresentam a capacidade nata de correr. Alguns, ao serem colocados nas raia da esteira simplesmente não se movem, sendo jogados contra a parede que delimita os espaços entre as raia. Assim, tais animais eram excluídos do experimento, não sendo utilizados nem para a formação do grupo sedentário. Apenas os animais que apresentaram uma capacidade nata para correr é que foram selecionados. Portanto, após serem selecionados 15 animais com estas características esses eram aleatoriamente divididos, inicialmente, em sedentários (n=5) e treinados (n=10). Desta forma, ao final de 12 semanas havia 15 animais, sendo n=5 por grupo (S, T e D). Depois de selecionados e antes de iniciar o treinamento os animais foram submetidos a uma semana de adaptação na esteira rolante que consistiu em sessões diárias de 15 min, numa velocidade máxima de 0,6 km/h.

Como a quantidade de gordura no coxim PE é reduzida não era possível fazer todos os ensaios pretendidos com o mesmo grupo. Assim, grupos experimentais que eram usados para a realização das análises metabólicas não eram usados para outros fins. O mesmo ocorreu quando analisamos a expressão dos genes de interesse, onde havia gordura necessária apenas para este fim. Portanto, para a formatação final desta tese foram utilizados 9 grupos experimentais de 15 animais cada, ou seja, um total de 45 animais para S, 45 para T e 45 para D. Desta maneira, quando apresentarmos os dados sobre peso corporal e peso de coxim teremos n=30, já os ensaios biológicos e o estudo da expressão gênica têm n=10. Para que não haja confusão na interpretação do “n” este será fornecido para cada estudo realizado.

3.3 Parâmetros avaliados durante o protocolo experimental

Durante as 12 semanas de protocolo experimental foi registrado semanalmente o peso corporal dos animais dos 3 grupos. Ainda, durante as 12 semanas foi mensurada a quantidade de ração e água ingerida por cada grupo, medida esta que foi realizada a cada 2 dias.

3.4 Sacrifício dos animais

Após as 12 semanas de protocolo experimental, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e sacrificados por decapitação (dois dias após a última sessão de treinamento). O sangue foi coletado para análises bioquímicas e hormonais (por kits específicos), amostras do músculo sóleo foram retiradas e o coxim adiposo periepididimal foi retirado e processado.

3.5 Atividade da enzima Citrato Sintase (CS)

A avaliação da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS) é usualmente utilizada como um marcador da capacidade aeróbia em músculo esquelético (LEE et al., 2001). Com o objetivo precípua de saber se o protocolo de treinamento utilizado neste experimento foi capaz de gerar uma adaptação na capacidade aeróbia nos animais, foram realizadas determinações da atividade máxima da CS no músculo sóleo. O aumento da sua atividade está positivamente correlacionado com uma maior eficiência metabólica na geração de ATP e como indicador do grau de adaptação ao exercício físico aeróbio crônico. A atividade da CS foi determinada segundo o método descrito por ALP et al., (1976), ou seja, 100mg de tecido foram homogeneizados em 1 ml de tampão de extração contendo Tris-HCL (50 mM), EDTA (1 mM, pH=7,4) e posteriormente centrifugados (6000 rpm, 15s, 4 °C). O sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade enzimática da CS. A absorbância foi monitorada a 412 nm, sendo o

coeficiente de extinção para este comprimento de onda: 13,6. Os resultados foram expressos em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína presente no extrato.

3.6 Determinações bioquímicas e hormonais

3.6.1 Glicose

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico da glicose-oxidase (LOTT; TURNER, 1975). Para tal procedimento utilizamos o kit Glicose Enzimático (CAT N°02200, LABORLAB, Guarulhos, S. P., Brasil).

3.6.2 Insulina, Leptina e Testosterona

As concentrações de insulina e leptina no soro foram determinadas por métodos de radioimunoensaio (RIE) utilizando anticorpos espécie-específicos (Kit RI-13K, insulina de rato, Kit RL-83K, leptina de rato, da Linco Research Inc., St. Charles, MO, Estados Unidos). Para a determinação de testosterona foi utilizado o Kit DSL-4000, testosterona de ratos da Diagnostics Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, Estados Unidos.

3.6.3 Ácidos Graxos Não Esterificados

Os ácidos graxos não esterificados foram dosados no soro através do kit da Wako (NEFA – HR(2)) que é um método enzimático *in vitro* quantitativo para a sua determinação.

3.6.4 Triacilgliceróis

Para avaliar as taxas de Triacilgliceróis (TAG) no soro dos animais utilizamos um kit específico para triglicérides Bioclin k005. Teste enzimático colorimétrico, somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Amostras: soro obtido livre de hemólise (para evitar resultados falsamente elevados) ou plasma colhido com EDTA ou heparina. O analito é estável durante 3 dias entre 2 e 8 oC e 30 dias a 10 oC negativos. O sangue deve ser colhido após um jejum de 12 a 14 horas. As amostras lipêmicas devem ser previamente diluídas com Cloreto de sódio a 0,85%, na proporção 1:2.

Técnica: Colocar em 3 tubos de ensaios marcados: B (blank), P (padrão) e D (desconhecido).

	B	P	D
Padrão	-	-	3 µL
Reagente 1	-	3 µL	-
Rvo Trab.	300 µL	300 µL	300 µL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37°C por 10 minutos. Ler a absorbância da amostra e do padrão em 500 nm (490-540 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 30 minutos.

Descrição dos cálculos:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância do padrão}}$$

Como a reação segue a Lei de Lambert-Beer, o Fator de calibração pode ser usado.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{\text{Concentração do padrão (100 mg/dL)}}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{mg/dL} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator de calibração}$$

Os resultados são expressos em mg/dL. A reação é linear até 900 mg/dL. Para amostras com valores acima de 900 mg/dL ou densidade óptica acima de 0,8, diluir a amostra com Cloreto de sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

3.6.5 Colesterol Total e suas frações

3.6.5.1 Colesterol total

Amostra: Soro ou Plasma heparinizado. Outros anticoagulantes interferem no resultado final. Não usar amostras visivelmente hemolisadas. As amostras podem ser guardadas refrigeradas antes da dosagem por uma semana ou por dois meses congeladas.

Técnica: Colocar em 3 tubos de ensaios marcados: B (blank), P (padrão) e D (desconhecido).

	B	P	D
Padrão	-	3 µL	-
Desconhecido	-	-	3 µL
Rvo Trab.	300 µL	300 µL	300 µL

Incubar a 37° C por 10 minutos. Retirar do banho-maria e ler em Espectrofotômetro a 505 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (490-530 nm), zerando o aparelho em Absorbância com B (blank). A cor é estável por 120 minutos.

Cálculos:

$$\text{Colesterol mg/dL} = D \times f$$

$$f = \frac{200 \text{ mg/dL}}{P}$$

Valores de referência:

Desejável: inferior a 200 mg/dL

Limítrofe: de 200 a 239 mg/dL

Elevado: superior a 239 mg/dL

3.6.5.2 HDL-Colesterol

Em um tubo de ensaio colocar 500 µL de amostra e agregar 50 µL de Reativo Precipitante. Homogeneizar agitando, sem inverter o tubo, por 20 segundos. Deixar no refrigerador por 30 a 40 minutos ou em banho de água (4 a 10°C) por 15 minutos. Não congelar. Centrifugar por 15 minutos à 3000 rpm. Usar o sobrenadante límpido como amostra. Em 3 tubos de ensaio, marcados B, P e D colocar:

	B	P	D
Sobrenadante	-	-	3 µL
Padrão	-	20 µL	-
Reativo de trabalho Colesterol	300 µL	300 µL	300 µL

Misturar e incubar por 15 minutos à 37°C. Após, retirar do banho e esfriar. Ler à 505 nm em espectrofotômetro ou em colorímetro com filtro verde (490-530 nm), zerando a aparelho com tubo B (blank).

Cálculos

$$\text{HDL Colesterol mg/dL} = D \times f$$

$$\text{Onde } f = \frac{45,7}{P}$$

3.7 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos do TA peri-epididimal foram isolados mediante a técnica de digestão de tecido pela collagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, 1 g do coxim adiposo PE foram retirados, picados com tesoura em finos fragmentos e incubados em 4,0 mL de tampão digestivo [DMEM, HEPES 25 mM, BSA 4%, collagenase tipo II (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) 1,25 mg/mL, pH 7,45, por cerca de 60 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 °C. Para a determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 µL da suspensão celular em tampão EHB foram colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (1000 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 análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico (aumento de 100x) e as células tiveram seus diâmetros mensurados através de contagem computadorizada realizada pelo programa Motic Image Plus 2.0. Para tal, foram medidas 50 células. A partir do diâmetro celular médio e admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

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

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).

3.8 Teste de captação de [^3H]-2DG em adipócitos isolados

As taxas de captação de ^3H -2DG em adipócitos isolados foram mensuradas na ausência (basal) e na presença de insulina em concentração efetiva máxima (10 nM). A ^3H -2DG é captada pela célula e transformada em ^3H -2DG-6-P, porém, a partir desta etapa, não é mais metabolizada e atua como inibidor alostérico da enzima subsequente da via glicolítica, a fosfo-glico-mutase. Aliquotas de 40 μL de suspensão celular (lipócrito conhecido por amostra) foram pipetadas em tubos plásticos, contendo ou não 2 μL de insulina (concentração final de 10 nM) e incubadas por 15 min a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 10 μL de ^3H -2DG (concentração final de 0,4 mM e 0,05 $\mu\text{Ci/tubo}$) e, passados 3 min exatos, o transporte foi interrompido com a adição de 250 μL de *phloretin* 0,6 mM (em tampão EHB e DMSO 0,05%) a 4 °C. Para avaliação da taxa de captação, 200 μL da mistura final foram transferidos para tubos de microcentrífuga (0,45 mL) contendo 200 μL de óleo de silicone (densidade 0,963 g/mL) que foram centrifugados por 10 s (microcentrífuga E, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, Estados Unidos). A centrifugação teve como objetivo separar a mistura em três fases: uma superior, contendo as células compactadas (agregado celular), uma intermediária correspondente ao óleo e uma terceira, mais inferior, constituída pelo tampão aquoso. Após a separação, a porção contendo o agregado celular foi recolhida mediante a secção do tubo com um estilete na altura da porção média da camada de óleo, transferida para um tubo contendo 2,5 mL de líquido de cintilação (EcoLumeTM, ICN

Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, Estados Unidos) e a radiação emitida foi aferida em contador beta (Tricarb 2100 TR, Packard Instruments, Meriden, CT, Estados Unidos). Para a determinação da incorporação inespecífica, foram adicionados, primeiramente a suspensão celular (40 μ L) em um tubo de ensaio e em seguida o *phloretin* (inibidor do transporte de glicose), antes de se acrescentar ^3H -2DG. Os resultados foram expressos em pmol/cm^2 de superfície celular e 10^6 células.

3.9 Teste de Incorporação de D-[U- ^{14}C]-Glicose ou ^{14}C -Acetato em lipídeos e oxidação de D-[U- ^{14}C]-Glicose ou ^{14}C -Acetato até $^{14}\text{CO}_2$ em adipócitos isolados

Adipócitos isolados foram colocados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/glicose 2 mM, pH 7,45 a 37 °C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5% e 5 μ L de D-[U- ^{14}C]-glicose (2 mM e 0,05 uCi/tubo), com ou sem insulina (10 nM). No caso do ^{14}C -acetato, as concentrações foram 2 mM e 0,05 uCi/tubo, sem a adição de insulina. Estes tubos foram vedados com tampas de borracha, enriquecidos de uma atmosfera com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e incubados por 60min em banho-maria a 37 °C. Ao término da incubação, as células foram rompidas com 0,2 mL de H_2SO_4 8 N injetado sobre a mistura de reação com uma seringa e imediatamente foi emborcado no tubo (para adsorver o $^{14}\text{CO}_2$ liberado da reação) um flaconete contendo papel de filtro (2 x 4 cm) embebido com 0,2 mL de etanolamina. Incubou-se por mais 30 min, a fim de que todo o $^{14}\text{CO}_2$ liberado fosse incorporado no papel de filtro. Após esse período, o flaconete foi preenchido com 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLumeTM, ICN Pharmaceuticals) para contagem da radioatividade beta incorporada (LIMA; BAO; GARVEY, 1994; RODBELL, 1964), que representa a fração de glicose ou acetato que foi oxidada a $^{14}\text{CO}_2$.

Em seguida, foi realizada a extração dos lipídeos mediante a adição de 2,5 mL de reativo de Dole (isopropanol:n-heptano:H₂SO₄ 8N, 4:1:0,25 v:v:v) no meio de incubação (DOLE; MEINERTZ, 1960). A mistura foi agitada por 4-5 vezes (sessões de 10s) em vórtex por 30min. Ao final desse período, foi adicionado 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada seguido de agitação em vórtex. Após a mistura ter decantado, alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídeos extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume™, ICN Pharmaceuticals) para contagem da radioatividade beta incorporada (LIMA; BAO; GARVEY, 1994; RODBELL, 1964). Os resultados foram expressos em nmol.10⁻⁶ cels⁻¹. h⁻¹.

3.10 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente ao estímulo com Isoproterenol

As taxas de lipólise basal e estimulada pelo agonista β-adrenérgico isoproterenol (Sigma) foram mensuradas em adipócitos isolados de ratos conforme o seguinte protocolo: 40 µL de suspensão celular (em tampão EHB contendo 5mM de glicose) foram transferidos para microtubos (0,6 mL) e incubados em presença de adenosina 0.3 µM por 30min. Em seguida acrescentou-se 20 µL de adenosina deaminase (ADA, Sigma, 0,2 U/mL em tampão EHB, pH 7,45) por mais 30min a 37 °C para permitir a degradação da adenosina (HONNOR; DHILLON; LONDOS, 1985). Após este período, as células foram incubadas por 60min 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 um banho de gelo seguido por centrifugação a 7000 rpm por 5min a 4 °C, para separar as células do meio de reação. Após a centrifugação aproximadamente 150µL do infranadante foram retirados e transferidos para outro tubo de 0,6ml sendo então 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) e usada como índice da taxa de lipólise. Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cels} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.11 Análise da condensação de cromatina por microscopia de fluorescência

Esta técnica foi empregada para a determinação do grau de apoptose dos tecidos. Foi realizada em microscópio de fluorescência utilizando o corante Hoechst 33342 (OTTO; TSOU, 1985). Uma amostra contendo 1 g de tecido foi isolado e os adipócitos ressuspensos em 20 uL de Hoechst 33342 (Molecular Probes) a 0,01 mg/ mL em solução salina (NaCl 0,9%). Após 10 minutos de incubação no escuro, 10 uL da amostra foram transferidos para uma lâmina de vidro e visualizados em Microscópio de Fluorescência no filtro 365/80 nm. O corante Hoechst 33342 é largamente usado para corar o núcleo de células vivas. Este corante permite distinguir o núcleo com cromatina condensada de células apoptóticas do núcleo com cromatina não condensada de células viáveis. As células foram analisadas usando o programa KS 300 (Carl Zeiss Vision).

3.12 Avaliação da expressão gênica do PPAR γ , C/EBP α , ADD1/SREBP1C, β 2M, PREF1 e Adiponectina

O estudo do processo de adipogênese foi realizado na gordura PE dos ratos. Este foi feito em duas etapas. A primeira visou analisar a expressão dos fatores de transcrição no tecido total, ou seja, uma amostra do tecido foi coletada e ali foram analisados os genes de interesse. Num segundo momento, analisamos a expressão dos genes de interesse no tecido na ausência adipócitos. Isso foi feito utilizando-se o método de isolamento dos adipócitos (descrito no item 3.7). Assim, ao final da digestão do TA com collagenase, fez-se uma leve centrifugação da mistura. Como os adipócitos isolados flutuam na suspensão celular, estes são recolhidos com uma pipeta e o material restante (livre dos adipócitos) é submetido a uma centrifugação mais intensa. O precipitado que se forma é denominado de estroma vascular, e é rico em fibroblastos,

pré-adipócitos, macrófagos, hemácias, etc. Este material celular foi analisado para se averiguar a expressão de PREF1 (marcador específico da presença e da quantidade de pré-adipócitos) e de Adiponectina (marcador da presença de adipócitos jovens). Com isto, objetivou-se avaliar a atividade adipogênica neste precipitado (estroma vascular).

3.12.1 Extração de RNA Total

Ao final do estudo, os animais foram decapitados e foram coletados cerca de 300 mg de tecido peri-epididimal, que foi imediatamente colocado em tubos 17 x 100 contendo Trizol Reagent (Invitrogen® - proporção de 1 ml para cada 100 mg de amostra), homogeneizados em Polytron® (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucerne, Suíça) por 30 s e colocados sobre o gelo. O material foi dividido em alíquotas de 1 mL e armazenado à -70 °C para posterior extração do RNA total. Outra amostra da gordura PE, agora pesando 1g, foi coletada e submetida ao processo de digestão por collagenase a fim de isolar os adipócitos (item 3.7 de material e métodos). Depois de feita a digestão o material foi submetido à centrifugação de 400 rpm por 10 segundos afim de se isolar os adipócitos maduros das demais células existentes no tecido. Os adipócitos maduros, que compreendem a camada sobrenadante, foram retirados e o infranadante foi submetido à centrifugação de 1500 rpm por 5min. O pellet formado é composto de pré-adipócitos, mas também há a presença de adipócitos recém-diferenciados, macrófagos, fibroblastos, e outras. O pellet, o qual será denominado de estroma, foi ressuspendido em 800ul de reagente trizol, homogeneizado em Polytron® (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucerne, Suíça) por 30s e colocado sobre o gelo.

Para a extração, os homogenatos foram incubados por 5min a 15 - 30 °C (temperatura ambiente) para permitir completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A seguir adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 s e incubou-se por 2 -

3min a 15 - 30 °C (temperatura ambiente). A mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15min, a 4 °C e três fases se formaram. A fase aquosa (superior) contendo o RNA foi transferida para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol. O material foi incubado por 10 min a 15 - 30 °C (temperatura ambiente) e centrifugado a 12000 x g por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado pela adição de 1 mL de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7000 x g por 5min a 4 °C. O sedimento foi rapidamente seco ao ar e dissolvido em aproximadamente 35 µL de água deionizada autoclavada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A quantificação do RNA total foi realizada mediante leitura espectrofotométrica da absorbância em 260 nm. Para análise da pureza do RNA dividiu-se o valor da absorbância a 260 nm pelo valor obtido a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas), cuja razão ideal para aceitação da amostra deve estar entre 1,6 a 2,0. As amostras foram armazenadas a -70 °C. Em média, as extrações de RNA que efetuamos, apresentaram uma razão equivalente a 1,8.

Para confirmar a integridade do RNA extraído, 2 µg das amostras foram submetidos à eletroforese em minigel de agarose 1% [MOPS 200 mM, acetato de sódio 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH=7.0, (solução 10x concentrada) e 4% de formaldeído] corado com 1 µg/mL de brometo de etídeo.

3.12.2 Síntese de cDNA por Transcrição Reversa (RT)

Inicialmente, às amostras contendo 5 µg de RNA total foram adicionados 1 µL de tampão DNase (10x) e 1 µL de DNase (1 U/µL) e incubou-se por 15 min a 25 °C. Esta etapa tem por finalidade evitar uma possível amplificação de DNA genômico que possa contaminar o RNA extraído. Em seguida, adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mM e incubou-se por 10 min a 65 °C. Na etapa três (síntese de DNA), foi adicionado aos 11 µL da amostra resultante acima, 1 µL de oligo DTs (146 ng/µL) e incubado por 10 min a 70 °C. Terminada esta reação, resfriou-se a mistura a 4 °C, acrescentou-se 4 µL de tampão da enzima transcriptase reversa (RT - 5x), 2 µL de dietiotreitol (DTT) 0,1 M, 1 µL de mistura de dNTPs 10 mM, e incubou-se por 10 min a 25 °C. Finalmente, foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript III) seguida de incubação por 50 min a 42 °C e mais 15 min a 70 °C. Todas as incubações foram realizadas em Termociclador Eppendorf®. O material (cDNA) foi então congelado em freezer a -20 °C até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

3.12.3 Reação em Cadeia da Polimerase a partir de cDNA (RT-PCR convencional) estudo dos genes de interesse

A análise dos genes foi realizada de duas formas, ou seja, no tecido adiposo total e no estroma. Para o tecido total foi utilizada a técnica de PCR convencional, e no estroma vascular foi realizada a técnica de PCR Real Time.

3.12.3.1 PCR Convencional

Alíquotas de 2 µl do produto da reação de RT foram adicionadas a 23 µl de um “mix” contendo 2,5 µl de tampão 10x *Taq* Polimerase, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,625 µl de cada *primer* *, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,25 µl (2,5 U) da enzima *Taq* DNA Polimerase e 17,25 µl de

água DEPC. As reações de PCR foram realizadas com um passo inicial de aquecimento para ativação da DNA Polimerase e desnaturação do cDNA template a 95 °C por 2 min. As condições de ensaio estão descritas na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Condições de Ensaio da Reação de RT – PCR convencional:

Genes	Iniciador 3'	Iniciador 5'	Temp. de hibridação (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Número de ciclos
RPL	5'-CAAGAAGGT CGGGATCGTCG 3'	5'-CCAGGCAAG TCTCAGGAGGTG-3'	57	290	24
PPARγ	5'-GAAACTGGCA CCCTTGAAAA-3'	5'-CCCTGGCAA AGCATTCGTAT-3'	62	237	35
ADD1	5'-ATGGGCAAG TACACAGGAGG 3'	5'-ATCCACGAA GAAACGGTGAC-3'	59	290	35
CEBPα	5'-CCTTGACCA AGGAGCTCTCA-3'	5'-GCCAAGAAG TCGGTGGATAA-3'	62	232	34

Em seguida, uma extensão final a 72 °C por 10min foi aplicada. Por fim, o material foi resfriado a 4 °C até a realização da eletroforese em gel de agarose.

3.12.3.2 Eletroforese do produto amplificado

Para tal os produtos de PCR obtidos foram aplicados (10 μ L) em gel de agarose 2 % [em tampão TBE 5x (Tris base 89 mM/ Ácido Bórico 89 mM/ EDTA 0,05 M e pH 8)] contendo brometo de etídio, sendo o mesmo tampão (TBE 1x) utilizado para a corrida do gel, sob tensão de 70 mV. Após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV. O gel foi fotografado utilizando equipamento de fotodocumentação (Analisador de gel de Eletroforese Eagle Eye System™ Stratagene, modelo 401304, software Eagle Sight 3.2) e para análise

densitométrica óptica das bandas obtidas utilizamos um programa apropriado para esta finalidade (Scion Image Software 4.02, Scion, Frederick, MD, Estados Unidos).

A expressão do RNA para cada gene foi normalizada em relação à expressão do gene constitutivo (RPL-37a), foi calculada pela razão entre os valores da densitometria dos *blots* dos gene de interesse e os valores foram expressos em unidades arbitrárias.

A técnica de RT-PCR empregada neste estudo é semiquantitativa. Os resultados foram representados em função da relação gene de interesse RPL-37a e comparados entre si, dentro de um mesmo experimento.

3.12.4 PCR Real Time

Esta técnica de PCR real time foi empregada na análise dos genes de interesse no estroma vascular do tecido PE. Para tal, às amostras de 1ul de cDNA adicionamos 12,5ul de Platinum Sybr Green aPCR supermix-UDG (Invitrogen), 9,5 ul H₂O DEPC, 1 ul primer sense e 1 ul primer anti-sense. A reação correu em termociclador ROTOR GENE 6000 (Cobertt Research, Mortlake, Austrália), sendo os primers, temperatura de anelamento e número de ciclos descritos na tabela 3. A análise da expressão gênica dos genes de interesse foi normalizada pela expressão do gene B₂M (constitutivo). A quantidade relativa do valor de cada gene alvo foi analisada utilizando o método do Ct (cycle threshold) comparativo proposto por Livak e Schmittgen (2001). O valor de Ct é o número de ciclos calculado onde o sinal de fluorescência emitido está significativamente acima dos níveis basais. Os pares de primers para a amplificação dos genes de interesse foram desenhados a partir das sequências depositadas no Genbank (Tabela 3).

Tabela 3 – Condições de Ensaio da Reação de RT – PCR Real Time:

Genes	Iniciador 3'	Iniciador 5'	Temp. de hibridação (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Número de ciclos
B₂M	5'-CAAGAAGGT CGGGATCGTCG 3'	5'-CCAGGCAAG TCTCAGGAGGTG-3'	56	290	40
PPAR_γ	5'-CTCACAATGCC ATCAGGTTTGG-3'	5'-CTTTGGTCAGC GGGAAGGAC-3'	56	168	40
Adp	5'-ACTCAGCATT CAGCGTAGGGC 3'	5'-TGGTCGTAGG TGAAGAGAACGG-3'	58	118	40
PREF1	5'-AAGGCTGGGA CGGGAAATTC-3'	5'-CTGGCAGGGAG AACCATTGATC-3'	57,5	185	40

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram analisados mediante a determinação das médias $\pm$ SEM dos dados individuais de cada grupo de animais. Essas médias foram comparadas mediante teste de análise de variância (ANOVA, unidirecional), seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. O limite fiducial de significância foi estabelecido em 5%.

Quando foram analisadas as relações apenas entre S e T (8 primeiras semanas) foi utilizado teste T.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do treinamento físico aeróbio crônico sobre a atividade máxima da enzima Citrato Sintase

A corrida em esteira rolante realizada ao longo de 12 semanas provocou aumento significativo na atividade máxima desta enzima (figura 1), evidenciando o fato de o protocolo utilizado ter sido eficaz no que diz respeito a gerar adaptações aeróbias (possivelmente aumento da biogênese mitocondrial) nos animais estudados. Este resultado denota que o protocolo de treinamento físico foi efetivo e que o destreinamento reverteu esta adaptação.

Figura 1. Atividade da Enzima Citrato Sintase. Efeito do treinamento físico aeróbio crônico e do destreinamento sobre a atividade máxima da enzima Citrato Sintase em ratos após 12 semanas de protocolo experimental. n=10. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.2. Efeito sobre o peso corporal

A evolução temporal do peso corporal dos animais durante o estudo está documentada na figura 2. Nela é observada a velocidade no incremento de peso corporal (em gramas) após o início do destreinamento físico (13^a. Semana de idade). Para toda a análise de peso corporal e peso do coxim PE foi utilizado n=30.

Figura 2. Velocidade no incremento de peso corporal. Efeito do treinamento físico aeróbio crônico e de sua descontinuidade sobre a velocidade de ganho de peso corporal. n=30.

A figura 3 demonstra o ganho de peso corporal dos animais submetidos ao protocolo experimental. O gráfico A representa o peso corporal inicial dos animais. Neste momento, só havia dois grupos: S e T. O gráfico B representa o peso corporal final dos animais (após 13 semanas). Observamos um ganho menor de peso dos animais T. O gráfico C representa o peso acumulado (em gramas) nas últimas 4 semanas quando o grupo D se iniciou. Verificamos um ganho de peso significativamente maior dos animais D em relação aos outros grupos. A recuperação de peso corporal dos animais destreinados os restituiu aos valores de peso equivalentes aos do grupo S.

Figura 3. Análise da evolução do peso corporal. Efeito do treinamento físico aeróbico crônico e de sua descontinuação sobre a evolução do peso corporal em ratos com 12 semanas de protocolo experimental. n=30. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

Os dados adicionais referentes ao peso corporal estão apresentados na tabela 4. Assim, podemos notar que o peso corporal dos animais após 8 semanas de treino (13 semana de idade) já era significativamente inferior ao peso dos animais sedentários, demonstrando desta forma que o treinamento proposto realmente foi eficiente no que tange a frear a evolução de peso dos animais na fase de desenvolvimento.

Tabela 4 – Pesos

	Sedentário	Treinado	Destreinado
Peso inicial (g)	202 ± 4,56 ^a	195,78 ± 3,53 ^a	
Peso acumulado - 8 primeiras semanas (g)	114 ± 8,27 ^a	89,11 ± 5,406 ^b	
Peso - 13ª semana (g)	344,8 ± 8,85 ^a	314,22 ± 7,11 ^b	
Peso acumulado - 4 últimas semanas (g)	30 ± 4,24 ^a	26 ± 4,4 ^a	46 ± 4,05 ^b
Peso final (g)	379,6 ± 10,09 ^a	326,5 ± 7,14 ^b	384 ± 13,08 ^a

Símbolo estatístico: letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Letras diferentes indicam significância estatística.

5.3 Análise da ingestão hídrica e do consumo de ração

5.3.1 Ingestão hídrica

A figura 4, a seguir, mostra os resultados da ingestão hídrica. O gráfico A representa a ingestão hídrica nas oito primeiras semanas onde tínhamos apenas dois grupos (S e T). Como podemos observar não há diferença estatística entre os dois grupos. A figura B representa a ingestão hídrica dos animais nas últimas quatro semanas. Podemos observar que consumo hídrico do grupo T apresentou-se significativamente reduzido em relação aos demais grupos. Para estas mensurações foi utilizado $n=10$.

Figura 4. Análise da ingestão hídrica. No gráfico (A) observam-se os consumos hídricos cumulativos referentes às oito primeiras semanas. O gráfico (B) representa a ingestão hídrica nas últimas quatro semanas, observamos um menor consumo hídrico dos animais T em relação aos S e D, $n=10$. Símbolo estatístico: letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Letras diferentes indicam significância estatística.

5.3.2 Consumo alimentar

A análise dos dados obtidos referentes ao consumo alimentar mostra que, nas oito semanas iniciais, não houve diferença estatística entre os grupos S e T (figura 5A), porém, nas últimas quatro semanas, em que o destreinamento foi introduzido, os animais dos grupos D e S apresentaram um maior consumo de ração quando comparados aos animais do grupo T (figura 5B). Para estas mensurações foi utilizado n=10.

Figura 5. Análise da ingestão alimentar. O primeiro gráfico (A) mostra o consumo cumulativo médio de ração ao longo das 8 primeiras semanas de estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos. O gráfico (B) demonstra o consumo alimentar das últimas 4 semanas onde iniciou-se o grupo D, observamos que os animais T ingerem menos ração quando comparados com S e D ,n=10. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística

5.4 Glicemia, Insulinemia, Leptinemia e Testosteronemia

Estes 4 parâmetros bioquímicos estão ilustrados logo abaixo na tabela 5. Observamos diferenças significativas apenas na Leptinemia, em que os valores são significativamente menores entre T e D. Assim, a recuperação do peso corporal com o destreinamento se acompanhou de aumento importante da leptinemia. Para estas mensurações foi utilizado n=15.

Tabela 5 – Dosagens hormonais

	Sedentário	Treinado	Destreinado
Glicemia (mg/dL)	108 ± 4,95 ^a	99,25 ± 3,99 ^a	102,39 ± 5,30 ^a
Insulinemia (ng/mL)	1,318 ± 0,131 ^a	1,210 ± 0,168 ^a	1,071 ± 0,102 ^a
Leptinemia (ng/mL)	2,651 ± 0,261 ^b	1,893 ± 0,320 ^a	2,984 ± 0,344 ^b
Testosterona (ng/mL)	0,731 ± 0,067 ^a	0,475 ± 0,02 ^a	0,657 ± 0,073 ^a

Símbolo estatístico: letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Letras diferentes indicam significância estatística.

5.5 Triacilglicerol (TAG), Colesterol Total, HDL Colesterol, LDL Colesterol e NEFA

A tabela 6 abaixo ilustra os resultados da dosagem sérica de lipídeos plasmáticos dos animais nos três grupos. Observamos que tanto o colesterol total como o TAG sofrem interferência do treinamento físico, pois os animais T apresentaram redução significativa do seu conteúdo em relação ao grupo S. As dosagens séricas de HDL e LDL colesterol não revelaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Para estas mensurações foi utilizado n=15. Também, a dosagem de NEFA não encontrou diferenças significativas.

Tabela 6 – Dosagens bioquímicas

	Sedentário	Treinado	Destreinado
NEFA	$0,758 \pm 0,012^a$	$0,722 \pm 0,017^a$	$0,759 \pm 0,019^a$
TAG	$37,85 \pm 3,08^a$	$30,86 \pm 2,41^b$	$34,01 \pm 2,13^{ab}$
Colesterol total	$36,63 \pm 1,78^a$	$30,67 \pm 1,17^b$	$34,60 \pm 1,63^{ab}$
LDL colesterol	$23,20 \pm 1,81^a$	$20,17 \pm 1,57^a$	$21,80 \pm 1,62^a$
HDL colesterol	$10,41 \pm 1,01^a$	$9,04 \pm 0,57^a$	$7,85 \pm 0,33^a$

Símbolo estatístico: letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Letras diferentes indicam significância estatística.

5.6 Peso do coxim adiposo peri-epididimal

Na figura abaixo (figura 6) podemos verificar que o treinamento físico promoveu diminuição do peso do coxim adiposo PE e que, com a interrupção do treinamento físico (no grupo D), houve uma recuperação completa da massa adiposa deste coxim, n=30 (tabela 4)

Figura 6. Avaliação do peso do coxim adiposo PE. Efeito do treinamento físico aeróbico e do destreinamento físico sobre o peso do coxim PE. n=30. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.7 Tamanho dos adipócitos da região peri-epididimal

No figura 7 abaixo, observamos diferenças significativas na área transversal dos adipócitos PE entre os grupos (S, T e D). Em (A) temos as fotografias dos cortes histológicos dos adipócitos PE. Em (B) temos a representação gráfica dessas medidas. Como se observa, o tamanho celular dos adipócitos periepididimais de ratos T foi menor que S, e este menor que D. Portanto a recuperação do peso dos animais D se acompanhou de recuperação da massa adiposa PE e de hipertrofia mais acentuada de seus adipócitos ($3474 \mu\text{m}^2 \pm 68,8 \mu\text{m}^2$ vs $1945,7 \mu\text{m}^2 \pm 45,6 \mu\text{m}^2$ vs $2492,4 \mu\text{m}^2 \pm 49,08 \mu\text{m}^2$, respectivamente).

Figura 7. Representação gráfica do tamanho dos adipócitos isolados. A figura 7A refere-se à imagem obtida por fotografia de cortes histológicas e que foi utilizada para fazer a mensuração do diâmetro das células (Figura 7B). n = 350~500 células. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.8 Estudo das capacidades metabólicas de adipócitos isolados

5.8.1 Captação de 2-Desoxi-D-Glicose (2DG)

Os resultados referentes à captação desta hexose em adipócitos isolados aparecem na figura 8. Os resultados mostram a captação de 2DG por 10^6 células. Os valores obtidos indicam que a resposta destas células à estimulação máxima com insulina (figura 8B) foi mais intensa em ratos D do que T, associando o maior crescimento adiposo e a hipertrofia celular a uma possível maior responsividade destas células à insulina, $n=10$.

Figura 8. Captação de 2DG em adipócitos isolados. Em A e B estão representados a captação de glicose por 10^6 células (A - captação sem o estímulo de insulina, e B – captação de glicose com o estímulo de insulina). Observamos que há diferença estatística significativa em D, T vs D, $n=10$. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.8.2 Oxidação da [U-¹⁴C]-Glicose até CO₂

Neste teste (ilustrado na figura 9), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Em (A) temos a Oxidação não-estimulada e em (B) a Oxidação maximamente estimulada por insulina, n=10.

Figura 9. Oxidação da glicose até CO₂. Não houve diferença estatística entre os grupos. p=0.049 T vs D basal, p=0.065 T vs D máximo, n= 10.

5.8.3 Oxidação de ^{14}C -Acetato até CO_2

O teste de oxidação de acetato até CO_2 teve por objetivo investigar a via oxidativa deste substrato. Estudos preliminares do nosso laboratório já nos indicaram que a insulina não interfere com a taxa de oxidação deste substrato e, portanto os estudos foram executados na ausência da estimulação hormonal. Os resultados estão apresentados na figura 10 e demonstram uma diferença significativa entre os animais T e D ($p < 0,05$).

Figura 10. Oxidação de ^{14}C Acetato até CO_2 . Foram observados diferenças significativas de aumento da oxidação com relação a este substrato. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.8.4 Incorporação de [U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos

Das mesmas células submetidas ao teste de oxidação da glicose, foram extraídos os lipídeos totais. A incorporação de glicose em lipídeos totais foi executada na ausência (A) ou na presença de insulina (B). A figura 11 mostra os resultados obtidos. Nota-se claramente que a capacidade de adipócitos de animais destreinados em incorporar glicose em lipídeos é mais acentuada que em animais treinados. Mais uma vez, a recuperação ponderal acompanhada de aumento da massa adiposa PE também se associou a maior capacidade de incorporação de glicose em lipídeos.

Figura 11. Incorporação de [U-¹⁴C]-glicose em lipídeos. Podemos observar tanto em A quanto em B que nos animais do grupo T ocorre uma diminuição significativa da incorporação de glicose em lipídeos nos adipócitos quando comparados com o grupo D que contrariamente obtiveram um aumento expressivo nesse ensaio. n=10. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.8.5 Incorporação de ^{14}C -Acetato em lipídeos

Este teste visou investigar a via de síntese de ácidos graxos a partir de acetato uma vez que este substrato tem apenas duas vias de metabolização: ou a completa oxidação ou a incorporação em lipídeos no resíduo ácido graxo do triacilglicerol. O teste pode ser utilizado como boa avaliação da lipogênese de novo (LDN). A figura 12 demonstra esses resultados. Aqui também vemos que a capacidade lipogênica de adipócitos de ratos D se tornou mais intensificada que a de ratos T.

Figura 12. Incorporação de ^{14}C -acetato em lipídeos. Observamos diferença significativa entre os grupos T vs D. $n = 10$. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.8.6 Lipólise em adipócitos isolados

A atividade lipolítica frente ao estímulo com agonista β -adrenérgico, o isoproterenol, foi determinada através da produção de glicerol nos adipócitos. Os resultados estão presentes na figura 13. Observa-se que adipócitos de animais treinados, quando estimulados com isoproterenol (figura 13B), mostram uma capacidade lipolítica reduzida em relação a animais sedentários. O destreinamento parece ter recuperado esta capacidade, embora os resultados não tenham se mostrado significativamente diferentes dos de animais T.

Figura 13. Efeito do treinamento físico e de sua descontinuidade sobre a lipólise basal e estimulada com Isoproterenol. Observamos diferença significativa entre o grupo T e grupo D na lipólise estimulada, $n=10$. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.9. Estudo da celularidade

5.9.1 PCR Convencional

Primeiramente foi realizada a padronização dos genes de interesse. A combinação do par de iniciadores gera um fragmento de 237 pares de base (pb) na amplificação do cDNA do PPAR- γ e 290 pb para o RPL. Já para o ADD1 o fragmento gerado foi de 290 pb e para o C/EBP α de 232 pb. Estabeleceram-se 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 e 44 ciclos para padronização do PPAR- γ ; 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44 ciclos para a padronização do ADD1; 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 e 34 ciclos para padronização do RPL; e 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42 ciclos para o C/EBP α .

Os estudos mostraram que a utilização de 35 ciclos para amplificação do PPAR- γ no tecido adiposo PE com temperatura de anelamento de 62 °C é o processo ideal e esta padronização foi utilizada para estudos semiquantitativos deste gene.

Conforme resultado obtido optou-se por 35 ciclos para a amplificação do ADD1 numa temperatura de anelamento de 59 °C. Já para o RPL optamos por 24 ciclos numa temperatura de anelamento de 57 °C. Por fim, conforme resultado obtido optou-se por 34 ciclos para amplificação do C/EBP α no tecido adiposo periepididimal com temperatura de anelamento de 62 °C.

A figura 14 abaixo resume os resultados encontrados para os genes acima mencionados na gordura PE. Como se nota, não foram observadas diferenças quantitativas nestes parâmetros, com n=10 para cada grupo experimental.

Figura 14. Expressão gênica (mRNA) para SREBP1/ADD1, C/EBPα e PPARγ na gordura PE. Os dados mostrados nos gráficos representam a média $\pm$ EPM de 5 experimentos completos e estão expressos em UA (unidades arbitrárias). Não foram observadas diferenças em relação ao efeito do treinamento ou do destreinamento quando comparados com o grupo S, n=10.

A sequência da *blots* abaixo mostram as respostas encontradas após a revelação autoradiográfica das eletroforeses em gel de agarose executadas com os mRNAs extraídos e amplificados dos três genes estudados. Os dados mostram 5 seqüências T D S em cada gel, indicando que 5 animais de cada grupo experimental foram analisados simultaneamente. Com isto, procurou-se evitar problemas com comparações de resultados feitas em géis diferentes.

5.9.2 PCR Real Time

Foi realizado então um estudo no estroma vascular do tecido adiposo PE a fim de analisar a diferença entre a quantidade de pré-adipócitos e adipócitos recém diferenciados. Para isso utilizou-se a técnica de Real Time PCR descrita anteriormente. A figura 15 expressa os resultados obtidos. A figura 15A representa os dados obtidos na análise da expressão do gene PPAR-gama. Notamos que o treinamento físico aumentou consideravelmente sua expressão, e o destreinamento não foi capaz de reverter tal aumento. Na figura B, observamos o gene PREF1, onde o treinamento físico acarretou em significativo aumento de sua expressão quando comparado ao grupo sedentário. Já, na figura C, está representado o gene da adiponectina, em relação ao qual o destreinamento físico fez aumentar significativamente a sua expressão em relação aos outros dois grupos, fazendo crer que no estroma vascular dos ratos destreinados há muito mais adipócitos recém diferenciados.

Figura 15. Representação gráfica da expressão dos genes de interesse no estroma vascular da gordura PE, n=5. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística.

5.10 Análise da condensação de cromatina por microscopia de fluorescência

Esta técnica nos permitiu estudar o grau de apoptose das células do coxim gorduroso PE. A figura 16 abaixo representa os resultados obtidos. Os resultados indicam que animais dos grupos T estão com apoptose reduzida quando comparada à apoptose basal do grupo S. Isto não foi revertido com o destreinamento, pelo menos dentro do período de 4 semanas de acompanhamento. Para este estudo foi utilizado n=10.

Figura 16: A: representação fotográfica da condensação da cromatina dos adipócitos do coxim PE. B: representação gráfica da fluorescência emitida. Observamos que o treinamento físico acarretou em uma significativa redução da taxa de apoptose nos adipócitos do coxim PE. O período de destreinamento não foi suficiente para que houvesse uma reversão desta alteração. n=10. Letras iguais indicam ausência de significância, letras diferentes indicam significância estatística

6 DISCUSSÃO

O tecido adiposo ganhou, nos últimos tempos, uma grande importância em consequência da descoberta da sua alta capacidade em sintetizar e secretar, no meio interno, substâncias dotadas de importantes propriedades biológicas. Essas substâncias têm sido genericamente denominadas de adipocinas, e o TA mostrou ser capaz de produzir uma grande variedade delas, tornando-se possivelmente o órgão endócrino mais hábil e prolífico. Com essa capacidade de secretar inúmeras mensagens não é surpreendente que consiga influenciar vários outros órgãos e sistemas ao mesmo tempo em que possui receptores igualmente de forma profusa. Dessa forma, a atividade funcional do TA o torna um órgão dotado de grande plasticidade, seja do ponto de vista endócrino, seja do ponto de vista metabólico, possibilitando-o a ser um candidato ideal para a execução de processos adaptativos.

O exercício físico é uma atividade que solicita de forma mais intensa a mobilização de substratos energéticos e adaptações ao exercício são necessárias para que o desempenho seja maximizado. O treinamento físico, que implica na construção de um hábito, é um modelo experimental ideal para se avaliar o desenvolvimento de adaptações metabólicas e celulares. Adjacente a este conceito está o destreinamento físico, que na teoria deveria devolver o organismo a condição de sedentarismo que este se encontrava quando do início do treinamento.

Nesse estudo, a preocupação central foi a de descrever processos adaptativos metabólicos e celulares que se desenvolvem em animais que são submetidos a um processo de destreinamento físico. Paralelamente, o estudo procurou avaliar as repercussões metabólicas e celulares também em animais que se mantiveram fisicamente ativos.

Para se dar credibilidade aos resultados que foram produzidos, houve uma preocupação inicial de se aquilatar se o treinamento físico utilizado estava realmente mostrando eficácia. Para isto, foi determinada a avaliação da atividade da enzima mitocondrial *citrato sintase* (CS) que é utilizada como um marcador clássico da adaptação ao exercício físico. Assim, no presente estudo, esta atividade foi determinada em amostras obtidas de músculo *soleus* e, de fato, verificou-se um aumento significativo da sua atividade. O aumento foi aproximadamente 20% superior ao observado nos animais sedentários e, com o destreinamento, o ganho obtido foi revertido completamente.

A importância em se mensurar a atividade máxima desta enzima se dá pelo simples fato desta ser a enzima dita “inicial” do ciclo de Krebs. O ácido pirúvico sofre algumas modificações químicas – perde um dióxido de carbono, transformando o composto de 3 carbonos em 2, ou seja, um grupo acetil. Este é ligado à coenzima A, formando o composto acetil-coA, através da piruvato desidrogenase. Este condensa-se ao oxaloacetato pela citrato sintase levando à produção de citrato, iniciando o ciclo de krebs. Lá ocorre a oxidação do ácido piúvico e o H⁺ produzido é levado para o sistema de transporte de elétrons pelos NADH e FADH. O treinamento físico é conhecido por aumentar a biogênese mitocondrial no músculo esquelético, mas muito pouco é conhecido sobre o efeito do exercício sobre a biogênese mitocondrial no TA. Há algumas maneiras farmacológicas de aumentar a quantidade de mitocôndrias tanto em células musculares como em adipócitos, sendo uma dessas o tratamento com Tiazolidinedionas (agonista PPAR γ). Entretanto esse tipo de tratamento geralmente acarreta em ganho de peso, tornando-o desfavorável em longo prazo.

Embora nós não tenhamos mensurado a quantidade de CS no TA, alguns estudos recentes vem sugerindo que o exercício físico também aumenta a quantidade e atividade das

mitocôndrias nos adipócitos. Em 2009 foi publicado um trabalho em que ratos foram submetidos a natação, 2h/dia, 7dias/sem, por 4 meses e foram analisadas proteínas que se relacionam com o numero e função das mitocôndrias. Assim, após o protocolo experimental foram estudadas proteínas da cadeia respiratória como a Citocromo C Oxidases subunidade IV (COX IV) e Citocromo C Oxidoreductase subunidade I (CORE I). Além disso, expressão gênica do coativador 1 do PPAR γ (PCG1- α , maior regulador da biogênese mitocondrial) e do Fator A de transcrição mitocondrial (Tfam – fator transcricional que antecede PCG1- α) também foram mensuradas. Os resultados obtidos demonstraram que todas as proteínas e genes estudados estavam com sua expressão aumentada no ratos treinados, sugerindo que o treinamento físico aumentou a quantidade e a atividade das mitocôndrias no TA (Sutherland et al., 2009).

Uma vez estabelecida a eficácia do programa de treinamento, as demais observações foram realizadas.

6.1 Repercussões gerais do treinamento e do destreinamento

6.1.1 Peso corporal e ingestão alimentar

O peso corporal apresentou uma evolução interessante. Nas primeiras 8 semanas, que constituem a primeira fase, houve um ritmo de ganho de peso discretamente menos intenso nos animais treinados em comparação aos sedentários, mas não houve diferença estatística entre os grupos. Na segunda fase, quando parte dos treinados sofrem interrupção do programa, verifica-se um aumento da defasagem de peso entre treinados e sedentários e os destreinados aceleram o ritmo de ganho de peso, conseguindo recuperar integralmente a defasagem. Uma análise confrontando o ganho de peso nas duas fases do projeto foi realizada paralelamente aos resultados apresentados (tabela 4). Nas primeiras 8 semanas, os animais em treinamento apresentaram uma eficiência alimentar caracterizada pelo consumo de $10,25 \pm 0,45$ g de alimento

para cada g de ganho de peso enquanto que os animais sedentários consumiam $9,15 \pm 0,67$ g de alimento para cada g de peso ganho, sem diferença estatística entre os grupos. Na segunda fase, quando parte dos animais eram destreinados, a eficiência alimentar resultou nos seguintes resultados em termos de g de alimento ingerida para cada g de ganho de peso corporal: T= $39,92 \pm 4,58$; S= $30,45 \pm 3,38$ e D= $21,21 \pm 2,16$. Observamos então algo bastante curioso. O destreinamento físico melhorou a eficiência alimentar dos animais e, somado ao aumento na quantidade absoluta na ingestão de ração pelo grupo D não foi de estranhar que esses animais apresentassem aumento de peso corporal. Importante observar que os ratos foram tratados com ração padrão e que a ingesta de calorias se dá até o momento da saciedade, quando o animal deixa de se alimentar. Diferente de uma dieta de cafeteria onde o animal é atraído pela palatividade da refeição, a ração padrão não tem este tipo de chamariz.

Na segunda fase do experimento, onde os animais já estavam com 14 semanas de idade, a curva de ganho de peso mostra que já começa a haver certa estabilidade no peso corporal e o ritmo de ganho é menor do que na primeira fase que engloba o crescimento mais acelerado do período puberal. Assim, não causa estranheza o fato de que a eficiência alimentar se reduza. Ainda assim, é intrigante que os animais destreinados apresentem um ganho na eficiência alimentar. Os mecanismos para propiciar a recuperação do peso merecem ser esclarecidos. A título de especulação, poderíamos hipotetizar que o treinamento físico, por mecanismos que precisam ser investigados, consegue modificar, ao nível do sistema nervoso central, em centros envolvidos com o controle do peso corporal, que incluem centros hipotalâmicos como os envolvidos no controle da ingestão de alimentos e regulação do comportamento alimentar, um “ponto de ajuste” (*set point*) para o peso corporal. Com a parada do programa de treinos, essa “inibição” central cessa e o animal destreinado retoma o *set point* pré-estabelecido.

Outros estudos já evidenciaram que os níveis séricos de Lep reduzem com o treinamento físico, mas nenhuma pesquisa conseguiu evidenciar que a redução ocorra de forma direta. O que se especula é que a redução ocorra devido à diminuição da massa gorda total, sendo então esta redução a responsável pela queda da concentração plasmática e não o exercício físico de forma direta (via sistema nervoso simpático, por exemplo). É curioso que os níveis de leptina de animais treinados são inferiores aos dos demais grupos. Com a parada do treinamento, é possível que a menor leptinemia contribua para acelerar o ritmo de ingestão alimentar contribuindo para o reajuste do peso corporal.

A Lep é largamente conhecida como sendo uma substância anorexígena, pois ela detém a propriedade de, em nível hipotalâmico, inibir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) cuja ação biológica relaciona-se com o aumento do apetite (orexígeno) (SCHWARTZ et al., 2000). O apetite é regulado por um complexo sistema de sinais centrais e periféricos que interagem para modular a resposta individual para a ingestão de nutrientes e não consiste em objetivo deste trabalho analisar e discutir o controle da ingestão alimentar, que trata-se de um fenômeno altamente complexo. A regulação periférica inclui sinais de saciedade vindos do estômago e TA, enquanto o controle central é realizado por vários efetores, incluindo sistemas monoaminérgico e endocanabinóide (ALGER, 2004; ENGELI et al., 2005) . Sinais de saciedade, incluindo colecistocinina (CCK), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY), originários do trato gastrointestinal (TGI) durante uma refeição alcançam, através do nervo vago, o núcleo do trato solitário (NTS) Do NTS se projetam fibras aferentes em direção ao núcleo arqueado (ARC), onde os sinais de saciedade são integrados com sinais oriundos do TA, geralmente leptina. Além disso, vários insumos hipotalâmicos também se integram a este sistema, criando uma complexa rede de circuitos neuronais que elaboraram a resposta de saciedade após uma refeição. Quanto ao

sistema neuropeptidérgico, neurônios do ARC secretam substâncias orexígenas, como o NPY e peptídeo agouti-related (AGRP), além de peptídeos anorexígenos, tais como pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrição de cocaína e anfetamina regulamentados (CART). Outras áreas cerebrais envolvidas no controle da ingestão alimentar estão localizados próximos ao ARC: entre estes o núcleo paraventricular (PVN), que produz peptídeos anorexígenos tais como o hormônio liberador da tireotropina (TRH), hormônio liberador de corticotropina (CRH) e ocitocina; a área lateral do hipotálamo (ALH) e perifornical (APF), que secretam substâncias orexígenas como a substância orexina-A (OXA) e o hormônio concentrador de melanócito (MCH) (VASSALI et al., 2008). Então, embora os dados obtidos em nosso estudo sejam curiosos, o estudo do controle da ingestão alimentar é bastante complicado e envolve muitas variáveis.

6.1.2 Peso do coxim adiposo

Os dados mostrados na figura 9 ilustram de forma clara que o treinamento provoca uma redução generalizada da adiposidade dos animais. Isto fica comprovado pela redução da massa do coxim PE. Este dado será futuramente complementado pela determinação do conteúdo total de gordura da carcaça dos animais. O destreinamento promoveu uma recuperação quase que completa da massa adiposa (tabela 4). Paralelamente, os resultados da leptinemia (figura 6), que podem ser utilizados como indicadores da reserva energética do TA, se recuperam completamente com o destreinamento. Diversos estudos já vêm relacionando a redução dos coxins adiposos com o treinamento físico, porém um número reduzido de estudos têm evidenciado de forma clara a recuperação de peso que ocorre durante a interrupção dos exercícios.

Yasari et al. (2006) observaram que ratas submetidas a destreinamento físico apresentavam maior capacidade em estocar gordura nos coxins urogenital, retroperitoneal e

mesentérico quando submetidas a uma dieta hiperlipídica. O aumento dos estoques de gordura com o destreinamento físico tem sido atribuído a inúmeros fatores incluindo aumento da sensibilidade à insulina e aumento da atividade da lipase de lipoproteína, por exemplo (APPLEGATE et al., 1984, CRAYG et al., 1983).

6.2 Repercussões endócrinas e bioquímicas

Este aspecto foi abordado mediante as determinações das concentrações plasmáticas em jejum de glicose, insulina, leptina e testosterona. Os dados indicam uma tendência não significativa de redução da glicemia de jejum de animais treinados em relação aos demais grupos. Isso não nos foi surpreendente pois o treinamento físico detém a propriedade de reduzir a concentração plasmática de glicose apenas em indivíduos que apresentam glicemia de jejum alterada, como no caso do diabetes ou resistência a insulina. Nossos animais eram sacrificados sempre após 12h de jejum, assim, por se tratarem de animais saudáveis, a não alteração da glicemia de jejum corresponde a um dado absolutamente coerente.

Pouca repercussão houve sobre a insulina e a testosterona. Chama a atenção a menor leptinemia dos treinados. Muitos fatores devem estar contribuindo para este resultado. Um deles seria o menor ganho de peso acompanhado de uma adiposidade menos desenvolvida de forma generalizada. Com o destreinamento houve uma recuperação da adiposidade de modo a equipará-la à dos sedentários. Como a leptina é um indicador das reservas energéticas do TA, a simples observação de menor massa adiposa já poderia justificar a leptinemia diminuída. Por outro lado, o protocolo de exercício utilizado poderia ser indutor de certo aumento da atividade simpática de forma mais ampla. Claro que já é largamente conhecido que o exercício físico reduz o tônus simpático durante o repouso, no entanto, durante o esforço físico as catecolaminas, agindo via receptores β -adrenérgicos, provocam aumentos das concentrações intracelulares de

AMPC, e podem inibir a biossíntese e liberação de leptina pelos adipócitos. Esta também poderia ser uma razão para o encontro de níveis reduzidos desta adipocina. Outras possibilidades podem ser aventadas, entretanto necessitariam de comprovação. Por exemplo, é possível que o treinamento físico atue como um redutor do nível de estresse dos animais. Assim, menor estresse, menor produção de glicocorticóides. Também é conhecida a ação estimuladora destes hormônios sobre a expressão gênica e protéica de leptina. Portanto, menor produção de glicocorticóides poderia significar menor estímulo para a liberação de leptina (CIMMINO et al., 2010). No entanto estas são apenas hipóteses e todas merecem ser comprovadas experimentalmente.

Já as dosagens dos lípides sanguíneos merecem ser mais bem estudadas. Observamos que tanto o colesterol total como o TAG sofrem interferência do treinamento físico, pois os animais T apresentaram redução significativa do seu conteúdo em relação ao grupo S. Sabe-se que o treinamento físico, principalmente o aeróbio, constitui um importante estímulo para a manutenção de concentrações fisiológicas de colesterol e TAG e que, pacientes com dislipidemias têm esses parâmetros controlados com a prática regular de exercícios (STASIULIS et al., 2010). As dosagens séricas de HDL e LDL colesterol não revelaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Sabe-se que a única forma de se elevar o HDL colesterol é através da prática de exercícios físicos regulares, enquanto a redução de outras frações do colesterol total podem ser reduzidas através de tratamentos farmacológicos (KRAUS et al., 2009). Entretanto, há indícios de que o exercício físico altere a concentração de HDL apenas em situações em que esta lipoproteína encontra-se reduzida, não tendo efetiva ação em sujeitos que apresentem normalidade nos padrões séricos desta fração do colesterol total. Para

estas mensurações foi utilizado n=15. Também, a dosagem de NEFA não encontrou diferenças significativas.

6.3 Testes biológicos com adipócitos isolados

6.3.1 Captação de 2-Desoxi-Glicose (2DG)

Os testes foram executados com células provenientes do coxim PE. A utilização de 2DG justifica-se pelo fato de a glicose ser um substrato importante para que a lipogênese possa ocorrer, não sendo o único, mas talvez o principal. Assim, a glicose entra na célula principalmente através de transportadores da família dos transportadores de glicose (GLUTs – *glucose transportes*) (JOOST et al., 2001). A família dos transportadores de glicose é constituída por proteínas de membrana, as quais são consideradas como sendo uma das mais importantes para a manutenção da homeostase glicêmica (BIRNBAUM, 1989). Existe hoje descrito na literatura 13 isoformas distintas de transportadores de glicose (GLUT1 a GLUT13), sendo o GLUT4 o único que tem sua ação regulada pelo hormônio Insulina. Essa isoforma está presente no tecido adiposo branco e marrom, como também na musculatura cardíaca e esquelética, sendo que nesta apresenta-se mais expresso em fibras de caráter predominante oxidativo (CHARRON et al., 1989; HENRIKSEN et al, 1990). O GLUT4 fica armazenado em vesículas intracelulares localizadas predominantemente no compartimento perinuclear da célula, durante o estado basal. Após a estimulação pela Insulina as vesículas que contém GLUT4 são translocadas para a membrana plasmática, favorecendo o transporte da hexose para o interior das células por gradiente de concentração (BRYANT et al, 2002). GLUT1 é responsável pela captação basal de glicose do tecido, sendo considerado um transportador constitutivo, ficando permanentemente inserido na membrana plasmática dos adipócitos.

Assim, após a glicose entrar nas células ela pode percorrer diferentes vias, dependendo do estado energético e metabólico da célula. Desta forma, parte desta glicose é desviada para a geração de energia para que a própria célula possa manter seu metabolismo e outra parte, dependendo da demanda, será estocada em forma de TAG. A 2DG é captada pela célula e imediatamente transformada em 2DG-6-P pela enzima hexoquinase, porém, a partir desta etapa, não é mais metabolizada e atua como inibidor alostérico da enzima subsequente da via glicolítica, a fosfo-glico-mutase.

Importante lembrar que o estudo das adaptações metabólicas ao destreinamento físico foram realizados *in vitro* e apenas nas condições basal e máximo. As interpretações sobre o que ocorre entre o basal e o máximo são difíceis de serem feitas. Ainda, a resposta máxima é atingida com uma dose de insulina suficiente para ativar a quase totalidade de receptores, o que dificilmente ocorre em uma condição fisiológica controlada. A análise dos resultados obtidos nos demonstrou que o treinamento físico não repercutiu em alterações na capacidade de captar glicose seja em condições basais seja pós-estimulação com insulina. Estudos realizados demonstraram que ratos submetidos a 10 semanas de natação tiveram a expressão gênica e protéica tanto do GLUT1 como do GLUT4 aumentadas na gordura PE (STALLKNECHT et al., 1993). Além disso, sabe-se que o treinamento induz aumento da captação de glicose insulino-dependente também nos adipócitos (FERRARA et al., 1998). Em nosso estudo não nos preocupamos em mensurar a quantidade absoluta de transportadores e sim verificar se o adipócito teria sua capacidade basal e máxima de captação de glicose alteradas. O fato de não ter havido diferença na captação com o treinamento físico não significa que não tenha ocorrido aumento dos transportadores.

No entanto, com o destreinamento essas células tornaram-se mais ativas em captar a hexose quando comparadas às células provenientes dos animais treinados e sedentários. As razões deste comportamento metabólico ainda não são muito claras. Teria o processo de crescimento desta massa adiposa após a interrupção do treinamento interferido com a sua responsividade à insulina? Já é sabido que quando ocorre aumento de adiposidade no organismo o TA passa a produzir maior quantidade de adipocinas com características pró-inflamatórias - $\text{TNF}\alpha$, IL6, resistina, entre outras – que sabidamente induzem resistência à insulina (ANTUNA-PUENTE et al., 2008). Entretanto isto não estaria acontecendo na região PE? Teriam estas moléculas ação parácrina induzindo resistência ou aumentando a sensibilidade à insulina localmente?

Assim, o quadro da regulação metabólica e da participação do TA no exercício físico crônico merecerá um aprofundamento ainda maior para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes.

6.3.2 Oxidação de D-[U- ^{14}C]-Glicose ou ^{14}C -Acetato até $^{14}\text{CO}_2$ em adipócitos isolados

Algumas similaridades podem ser constatadas na metabolização da glicose como as descritas para o caso da captação da glicose. As células da gordura PE de ratos destreinados apresentaram uma resposta basal e máxima de oxidação da glicose maior em relação aos animais treinados. Embora os dados não tenham dado significância não podemos deixar de atentar que a tendência é bastante forte ($p=0.049$ T vs D basal, $p=0.065$ T vs D máximo) assim, possivelmente o aumento do número de animais para redução do erro médio dará conta de dirimir tal dúvida. Entretanto, sabe-se que o aumento da demanda energética produzido pelo exercício físico causa aumento da oxidação de ácidos graxos e glicose pelos adipócitos (COYLE et al., 1997). O que notamos é que o treinamento não alterou a oxidação da glicose quando comparamos ao grupo

sedentário, mas há uma defasagem importante quando relacionamos o grupo T com D. Nesta análise o destreinamento físico aumentou a capacidade máxima de oxidação. Tal fato merece ser melhor estudado, mas talvez o destreinamento, por induzir aumento na capacidade lipogênica da célula, oxide mais glicose como forma de produzir energia suficiente para as ligações entre os ácidos graxos e o glicerol na formação da molécula de TAG.

O caminho metabólico para a oxidação da glicose pressupõe que a mesma seja primeiramente metabolizada até a geração de piruvato, que é transportado para mitocôndria onde, pela ação da enzima piruvato desidrogenase é transformada em acetil-CoA, dando assim entrada para o ciclo dos ácidos tricarboxilícos. O aumento na eficiência desta via metabólica pode estar em qualquer dos diversos passos, desde a fosforilação da glicose até a geração de acetil-CoA. A realização deste ensaio com glicose marcada possibilita visualizar a via de forma geral, onde é colocada uma quantidade de substrato marcado no início da reação e mede-se o produto final, que no caso é o CO_2 marcado. Desta maneira é impossível averiguar em qual passo da via oxidativa a melhora da eficiência ocorreu.

Para tentar um início de esclarecimento resolvemos utilizar o substrato acetato, que é captado pelas células e convertido a acetil-CoA. Diferente do que ocorre com a glicose apenas uma etapa é importante na oxidação do acetato, que é a sua transferência para a matriz mitocondrial. Com a sua utilização foi possível identificar que a maior taxa de oxidação de glicose observada, em adipócitos PE de ratos destreinados em relação aos treinados, tem maior probabilidade de ser devida ao aumento na eficiência do processo de oxidação mitocondrial do acetato e não à metabolização da glicose até piruvato.

6.3.3 Incorporação de glicose e de acetato em lipídeos totais

A biossíntese de TAG no tecido adiposo é um processo muito ligado à metabolização da glicose. Após o seu transporte e a sua fosforilação inicial pela hexoquinase, as etapas seguintes são a geração de frutose-6-P e frutose-1, 6-(P)₂. Este último produto é cindido em di-hidroxi-acetona-P (DHAP) e gliceraldeído-P (GAP). O primeiro (DHAP) é convertido a glicerol-P que é a base para a esterificação de ácidos graxos. No entanto, parte da metabolização da glicose até gerar TAG passa pela síntese de acetil-CoA que posteriormente é convertida em malonil-CoA e subsequentemente em ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) pela ação da enzima ácido graxo sintase (FAS). Portanto, ao se avaliar a incorporação de glicose em lipídeos, os carbonos da hexose podem gerar tanto o resíduo glicerol como o resíduo ácido graxo livre (FFA). A figura 11 mostrou haver alteração na capacidade lipogênica nos adipócitos isolados das gorduras PE. Esta maior eficiência poderia justificar a recuperação da massa do coxim PE dos animais destreinados, que após 4 semanas atingem o mesmo peso dos animais sedentários. Uma vez que o metabolismo da síntese de ácidos graxos do tecido adiposo a partir da glicose forneceu alguns subsídios para uma análise mais clara, sentimos a necessidade de acessar este processo pelo uso do acetato como substrato. Como discutido anteriormente, a incorporação de acetato em lipídeos totais (TAG) só é possível pela sua incorporação no resíduo FFA. Esta manobra indicou que o processo da lipogênese de novo (LDN), isto é, da síntese de ácidos graxos de cadeia longa a partir de acetil-CoA, estava obedecendo à mesma tendência apresentou diferenças entre os grupos de animais estudados.

6.4 Adipogênese: expressão gênica: PPAR γ , C/EBP α e SREBP1/ADD1

O TAB está envolvido na regulação da homeostase energética através de seu metabolismo e da liberação de várias moléculas bioativas chamadas adipocinas

(PRUNET-MARCASSUS et al., 2006). Caracteriza-se por ser um dos tecidos mais plásticos do organismo, sofrendo modelações e remodelações que variam de acordo com o estado metabólico do animal, fatores fisiológicos, estímulos nutricionais e patológicos. Por exemplo, o jejum e a realimentação induzem a redução e ampliação do TAB, respectivamente. Além disso, o treinamento físico crônico tem sido bem reconhecido como sendo um importante estímulo para reduzir a massa do TAB. Uma das razões para a redução da massa adiposa está na hipotrofia de adipócitos maduros, o que pode ser associada a uma maior lipólise nos adipócitos de animais treinados quando comparados a indivíduos da mesma espécie, porém sedentários (ASKEW et al., 1975; BUKOWIECKI et al., 1980).

A adipogênese é modulada por uma cascata de fatores de transcrição, incluindo o PPAR γ e família C/EBP, que são cruciais para a indução do fenótipo do adipócito. PPAR γ e C/EBPs juntos promovem a diferenciação dos adipócitos, ativando a expressão de genes específicos do adipócito (ROSEN; SPIEGELMAN, 2000). Por outro lado, alguns fatores inibidores da adipogênese foram identificados. Por exemplo, a sustentada expressão do Pref-1 inibe a diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos. Sendo assim, a redução da expressão de Pref-1 no tecido adiposo correlaciona-se positivamente com o aumento do processo de adipogênese (SMAS; Sul, 1993).

Embora o estudo do fenômeno da adipogênese seja largamente realizado e há excelentes revisões a respeito (GREGOIRE, 1996), a maioria dos estudos utiliza linhagens celulares imortalizadas (3T3-L1, 3T3-F442A, Ob1771, etc), e os estudos com pré-adipócitos primários extraídos de tecidos de animais ou humanos ainda são relativamente escassos e carentes de uma abordagem mais adequada. Este trabalho, pela sua própria característica, irá se concentrar na abordagem de pré-adipócitos primários. Como primeira abordagem, foram estudados os genes

mencionados no *caput* deste item por serem genes essenciais (*master genes*) do processo adipogênico.

Pelos resultados expressos na figura 14 não se detectaram diferenças na expressão desses genes que pudessem ser associadas com o *status* de treinamento ou de sedentarismo dos animais, na gordura PE. No entanto, esse resultado não afasta a possibilidade de que o processo de adipogênese não tenha sido afetado. A expressão desses genes foi obtida de amostras do tecido adiposo total e não de uma população de pré-adipócitos extraída.

Em um segundo momento, estudamos a expressão de genes de interesse no estroma vascular da gordura PE. Aqui, onde foram retirados os adipócitos maduros, os resultados foram surpreendentes, como ilustrados na figura 15. Podemos detectar que tanto o treinamento físico quanto o destreinamento influenciaram significativamente a expressão do fator de transcrição PPAR-gama (figura 15A).

Uma vez observado isso resolvemos então averiguar se o tratamento empregado repercutiu de alguma forma na população de pré-adipócitos de nossa amostra. A figura 15B representa a quantificação do cDNA do Pref1, importante marcador da presença de pré-adipócitos. Notamos que o treinamento físico representou importante estímulo no aumento da população dessas células, e que o destreino reverteu este quadro de alguma forma. Entendemos por esta observação que o treinamento físico, por aumentar a expressão gênica do Pref1, constitui em um estímulo importante para que ocorra uma inibição do processo de adipogênese. Mesmo o gene do PPAR γ estando aumentado neste grupo (figura 15A) não foi suficiente para promover a diferenciação celular, uma vez que no estroma vascular dos animais treinados não havia maior quantidade de adiponectina quando comparado ao estroma vascular dos animais sedentários (figura 15B). Observações recentes relataram que a expressão de mRNA do glicerol-3-fosfato

desidrogenase (GPDH), um marcador da diferenciação dos adipócitos, no estroma vascular de ratos treinados foi significativamente menor em comparação com o de ratos controle. Além disso, a expressão de mRNA dos reguladores de sinalização da proteína G-2 (RGS2) que é induzido na fase inicial de diferenciação das células de adipócitos 3T3-L1 e que promove a diferenciação dos adipócitos foi também infra regulada no estroma vascular de ratos treinados, sugerindo fortemente que o treinamento físico detém a capacidade de reduzir o processo de adipogênese (MOUSTAID et al., 1990; IMAGAWA et al., 1999)

Então, se o treinamento físico representa um fator de inibição do processo de adipogênese, quando retiramos esta inibição pudemos observar algo de grande importância. Embora os resultados apresentados e o apoio da literatura nos remetam a concluir que o treinamento inibe a adipogênese é inegável que houve aumento significativo no número de pré-adipócitos no estroma dos animais treinados. Adicionalmente a isso há também aumento no mRNA do PPAR γ , deixando um ambiente bastante propício para a adipogênese (Pref1 + PPAR γ = adipócitos jovens). Acontece que de alguma maneira o treinamento físico promove inibição deste processo e quando retiramos esta inibição (destreinamento) há uma explosão no número de adipócitos jovens de nossa amostra. Inicialmente observamos que o destreinamento físico promoveu redução importante dos Pref1 (figura 15B). Surgiu então uma dúvida: será que a redução da quantidade de pré-adipócitos no grupo destreinado ocorreu porque estas células se diferenciaram para adipócitos? Resolvemos então investigar e analisar se no estroma vascular havia adipócitos já diferenciados, porém ainda jovens e por isso com alta densidade, o que fez com que estes ainda não flutuassem no tampão de extração. A figura 15C demonstra claramente que o destreinamento físico fez aumentar significativamente a quantidade de adipócitos da amostra, como demonstra o aumento da expressão de adiponectina nesta fração celular, aumento

este muitas vezes superior aos demais grupos. Isto demonstra que os pré-adipócitos do grupo destreinado se diferenciaram em maior quantidade a adipócitos, fato este corroborado pela aumentada expressão de gene do PPAR γ durante o destreino. Pensamos que o treinamento físico deva exercer algum fator inibitório sobre a diferenciação, e quando retirado o treinamento este fator inibitório deixa de agir, levando a um processo de diferenciação bastante exacerbado.

6.5 Apoptose

Para estudarmos se realmente houve um aumento total do número de células não basta apenas entendermos o processo de adipogênese. É necessário também estudarmos o processo de apoptose. O número de células do TA é calculado através de uma razão adipogênese/apoptose. Se a adipogênese estiver aumentada e a apoptose também, provavelmente o número de células permanecerá constante.

Para tal, realizamos estudo para averiguar se o tratamento proposto repercutiu de alguma forma o processo de apoptose. Foram observadas alterações muito interessantes. Na gordura PE, o treinamento físico resultou numa redução bastante significativa na taxa de apoptose, e o destreinamento não foi suficiente para reverter este processo. Desta forma, podemos dizer que ao final do estudo, o coxim gorduroso PE apresentava uma maior quantidade de células adiposas, pois durante todo o processo a taxa de perda celular estava reduzida.

Algumas hipóteses podem justificar tal redução da morte celular observada nos animais treinados e destreinados. O fato de o exercício físico aeróbio acarretar em grande mobilização de ácidos graxos no TA pode levar o tecido a desenvolver certa proteção que evite a redução da massa celular total, o que ajudaria a manter uma reserva de gordura em nível mais adequado mesmo esta sendo fortemente consumida durante o exercício. Estudo realizado em ratos submetidos a 2,3 e 6 meses de exercícios aeróbios moderados demonstrou haver redução

significativa da apoptose no tecido cardíaco desses animais, aventando a hipótese de um efeito cardio protetor do exercício sobre as células estriadas cardíacas (SOUFI et al., 2008). No entanto percebemos que há certas diferenças em alguns resultados obtidos em diferentes pesquisas realizadas recentemente, fato este que torna o assunto da apoptose celular ainda pouco conhecido. Por exemplo, foi descrito que o exercício físico exaustivo provoca dano no DNA da célula desencadeando aumento na taxa de apoptose celular (NEUBAUER et al., 2007). Hipoteticamente, os danos ao DNA induzido pelo exercício pode ser uma consequência de processos inflamatórios envolvidos e alterações imunológicas após o exercício extenuante prolongado (por exemplo, induzindo a apoptose de linfócitos e linfocitopenia), o que não ocorre no exercício físico de moderada intensidade, que parece desenvolver efeitos protetores. No entanto, até agora, poucos estudos têm abordado esta questão e não há qualquer prova a respeito de uma relação direta entre os danos cromossômicos no DNA e respostas inflamatórias no contexto do exercício, necessitando então de um aprofundamento dos estudos para melhor compreensão deste fenômeno. A imagem mais conclusiva de que emerge a partir dos dados disponíveis é que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONs) parecem ser os principais efetores que ligam os processos inflamatórios com danos no DNA, e sabidamente se conhecem os efeitos antioxidantes do exercício físico aeróbio de moderada intensidade.

Adicionalmente, a redução da massa gorda advinda de um programa de exercícios físicos aeróbios reduz a expressão gênica e protéica do TNF- α . A expressão desta citocina encontra-se aumentada em diversos modelos de obesidade e humanos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Sabe-se que o TNF- α é um componente importante no desenvolvimento da resistência a insulina presente em pacientes obesos (STEPHENS et al., 1997). Em adição o TNF- α pode reduzir a massa adiposa por reduzir a diferenciação do adipócitos e a lipogênese (XU et al., 1999). Ainda,

sabe-se que esta citocina tem a propriedade de estimular a apoptose e a lipólise, acarretando assim na redução da massa gorda total. Embora nós não tenhamos mensurado a expressão do TNF- α podemos inferir que o treinamento aeróbio moderado, por reduzir a massa adiposa total, reduz também a expressão desta citocina. Assim, menor quantidade de TNF- α reduziria a taxa de apoptose, corroborando com os dados encontrados em nosso estudo. O interessante foi observar que a retirada do exercício e a retomada da massa adiposa nos animais destreinados não foi suficiente para reverter a queda da apoptose observada durante o treinamento, sugerindo então que outro mecanismo esteja envolvido neste processo, o que merece ser melhor averiguado.

7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho são eloquentes em mostrar que o treinamento promove uma atenuação no ganho de massa adiposa em comparação com animais sedentários. Essa conclusão está explicitada desta forma porque como os animais utilizados no estudo eram inicialmente jovens (6 semanas de idade) e ainda púberes, não se pode concluir que o treinamento reduz a massa adiposa, pois nesta fase da vida o tecido está em franco crescimento. Assim, no momento do sacrifício dos animais, já na fase adulta, o treinamento deve ter impedido o pleno desenvolvimento da massa adiposa. Caso o projeto tivesse utilizado ratos adultos desde o início, talvez pudéssemos concluir que o treinamento poderia ter induzido redução de massa adiposa já pré-formada. Com este arrazoado, preferimos explicar os resultados, não como redução da massa adiposa, mas como redução no seu ritmo de crescimento o que, ao final, resulta em clara redução da adiposidade.

Por outro lado, o destreinamento aumentou a resposta máxima de transporte de glicose quando comparado aos demais grupos, assim como promoveu aumento da atividade lipogênica quando comparado aos treinados, o que pode ter contribuído para a hipertrofia deste coxim observada na análise histológica.

O destreinamento físico constituiu uma manobra bastante eficaz para se estudar as alterações metabólicas e celulares no TA. Foi notória a redução da apoptose e o aumento da adipogênese, permitindo-nos concluir que o destreinamento físico é um potente indutor de aumento da celularidade, por alterar a taxa de *turnover* celular deste tecido. Assim, não está incorreto inferir que a interrupção de um programa de exercícios físicos pode ser uma possível causa da gênese da obesidade.

Como observação final, é preciso ter em mente que o tecido adiposo é muito complexo, e esta complexidade se manifesta pela diferente capacidade de adaptação metabólica dos seus diferentes territórios, e que ajustes parácrinos locais específicos devem ser atuantes em cada região de modo que não é recomendável que se façam conclusões generalizadas extrapoláveis para toda a massa gorda do organismo pela simples observação de um determinado território adiposo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. M. ; GUZDER, R.; WALLACE, A. M.; THOMAS, J.; FRASER, W. D.; VORA, J. P. Circadian and ultradian rhythm and leptin pulsatility in adult GH deficiency: effects of GH replacement. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v. 86, p. 3499–3506, 2001

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

AHREN B. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. **Acta. Physiol .Scand.**, v.169, p. 325–331, 2000.

ALONSO-VALE, M. I.; ANDREOTTI, S.; PERES, S. B.; ANHE, G. F.; DAS NEVES BORGES-SILVA, C.; NETO, J. C.; LIMA, F. B. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, n. 4, p. 805-12, 2005.

ALGER, B. E. Endocannabinoids: getting the message across. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 8512-3, 2004.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, v. 15, p. 689-700, 1976.

ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, .J. P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab.**, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2008.

APPLEGATE, E. A.; UPTON, D. E.; STERN, J. S. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne–Mendel rats made obese by a high-fat diet. **J. Nutr.**, v. 114, p. 447–59. 1984.

ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, K.; MIYAGAWA. J.; HOTTA, K.; SHIMOMURA, I.; NAKAMURA, T.; MIYAOKA, K.; KURIYAMA, H.; NISHIDA, M.; YAMASHITA, S.; OKUBO, K.; MATSUBARA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 257, p. 79–83, 1999.

ASKEW, E. W.; HUSTON, R. L.; PLOPPER, C. G.; HECKER, A. L.. Adipose tissue cellularity and lipolysis. Response to exercise and cortisol treatment. **J. Clin. Invest.**, v. 56, p. 521-529, 1975.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. P.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. **Wiley-Interscience**, 1995

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J. P.; ORTOLUZZI, M. N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M. J. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790–793, 1998.

BERNARD, G.; SCOTT, O. Role of Exercise Intervention in Improving Body Fat Distribution and Risk Profile in Children. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 11, n. 2, p. 237–247, 1999.

BIRNBAUM, M. J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. **Cell**, v. 57, p. 305–315, 1989

BORGES-SILVA, C. N.; ALONSO-VALE, M. I.; FRANZOI-DE-MORAES, S. M. TAKADA, J.; PERES, S. B.; ANDREOTTI, S.; SKORUPA, A. L.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **J. Pineal . Res.**, v. 38, n. 4, p. 278–83, 2005.

BRYANT, N. J.; GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n. 4, p. 267–77. Apr, 2002. Review

BUKOWIECKI, L.; LUPIEN, J.; FOLLEA, N.; PARADIS, A.; RICHARD, D.; LEBLANC, J. Mechanism of enhanced lipolysis in adipose tissue of exercise-trained rats. **Am. J. Physiol.**, v. 239, n. 6, p. 422–9, 1980.

CAO, Z.; UMEK, R. M.; MCKNIGHT, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **Genes De.**, Sep. v. 5, n. 9, p. 1538–52, 1991.

CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. **Front Neuroendocrinol.**, v. 20, p. 317–363, 1999.

CHEUNG, A. T.; REE, D.; KOLLS, J. K.; FUSELIER, J.; COY, D. H.; BRYER-ASH, M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. **Endocrinology**, v. 139, p. 4928–4935, 1998.

CIMMINO, M. A.; ANDRAGHETTI, G.; BRIATORE, L.; SALANI, B.; PARODI, M.; CUTOLO, M.; CORDERA, R. Changes in adiponectin and leptin concentrations during glucocorticoid treatment: a pilot study in patients with polymyalgia rheumatica. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1193, n. 1, p. 160–3, 2010.

CHARRON, M. J.; BROSIUS, F. C.; ALPER, S. L.; LODISH, H. F. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 2535–2539, 1989.

CINTI, S.; FREDERICH, R. C.; ZINGARETTI, M. C.; DE MATTEIS, R.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. **Endocrinology**, v. 138, p. 797–804, 1997.

COMUZZIE, A. G.; FUNAHASHI, T.; SONNENBERG, G.; MARTIN, L. J.; JACOB, H. J.; BLACK, A. E.; MAAS, D.; TAKAHASHI, M.; KIHARA, S.; TANAKA, S.; MATSUZAWA, Y.; BLANGERO, J.; COHEN, D.; KISSEBAH, A. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p. 4321–4325, 2001.

CONVERTINO, V. A.; BLOOMFIELD, S. A.; GREENLEAF, J. E. An overview of the issues: physiological effects of bed rest and restricted physical activity. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 29, n. 2, p. 187-90, 1997.

COYLE, E. F.; JEUKENDRUP, A. E.; WAGENMAKERS, A. J.; SARIS, W. H. Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 268–275, 1997.

COYLE, E. F.; MARTIN, W. H.; SINACORE, D. R.; JOYNER, M. J.; HAGBERG, J. M.; HOLLOSZY, J. O. Time course of loss of adaptations after stopping prolonged intense endurance training. **J. Appl. Physiol.**, v. 57, n. 6, p. 1857-64, 1984.

CRAIG, B. W.; THOMPSON, K.; HOLLOSZY, J. O. Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 54, p. 571–5. 1983.

DESNOYERS, F.; VODOVAR, N. Etude histologique comparée chez le porc et le rat du tissu adipeux périrenal au stade de son apparition. **Biol. Cell.**, v. 29, p. 177-182, 1977.

DRENTH, J. P.; VAN UUM, S. H.; VAN DEUREN, M.; PESMAN, G. J.; VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J.; VAN DER MEER, J. W. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF- α and IL-1 β production. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, p. 1497–1503, 1995.

DOLE, V. P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 235, p. 2595-9, sep, 1960.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet.**, v. 365, p. 1415-28, 2005.

ELSE, R. M.; VAZ, M.; COLLIER, G.; NESTEL, P.; JENNINGS, G.; KAYE, D.; SEALS, D.; LAMBERT, G. Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. **Lancet**, v. 351, p. 879, 1998.

ENGELI, S.; BOHNKE, J.; FELDPAUSCH, M.; GORZELNIAK, K.; JANKE, J.; BATKAI, S. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. **Diabetes**, v. 54, p. 2838-43, 2005.

FAIN, J. N.; MADAN, A. K.; HILER, M. L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, p. 2273–2282, 2004.

FEBBRAIO, M. A.; STEENBERG, A.; STARKIE, R. L.; MCCONELL, G. K.; KINGWELL, B. A. Skeletal muscle interleukin-6 and tumor necrosis factor- α release in healthy subjects and patients with Type 2 diabetes at rest and during exercise. **Metabolism.**, v. 52, p. 939–944, 2003.

FERRARA, C. M.; REYNOLDS, T. H.; ZARNOWSKI, M. J.; BROZINICK, J. T.; CUSHMAN, S.W. Short-term exercise enhances insulin-stimulated GLUT-4 translocation and glucose transport in adipose cells. **J. Appl. Physiol.**, v. 85, n. 6, p. 2106-11. 1998.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 763–770, 1998.

FRUHBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, F. J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 280, n. 6, p. 827-47, review. 2001

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 783–809, 1998.

GREGOIRE, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**. v. 226, n. 11, p. 997-1002, 2001.

GODOY-MATOS, A.; MOREIRA, R. O. Síndrome Metabólica: Do diagnóstico ao tratamento. **Diabetes mellitus**, n. 16, p. 171-82, 2006.

GUEDES, D. P.; GUEDES, J. E. R. P. *Controle do peso corporal: composição corporal, atividade física e saúde*. **Midiograf**. Londrina, 1989.

GUSTAT, J.; SRINIVASAN, S. R.; ELKASABANY, A.; BERENSON, G. S. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: the bogalusa heart study. **J. clin. epidemiol.**, v. 55, p. 997-1006, 2002.

GUTIN, B.; OWENS, S.; OKUYAMA, T.; RIGGS, S.; FERGUSON, M.; LITAKER, M. Effect of physical training and its cessation on percent fat and bone density of children with obesity. **Obes. Res.**, v. 7, n. 2, p. 208-14, 1999.

HEILBRONN, L. K.; ROOD, J.; JANDEROVA, L.; ALBU, J. B.; KELLEY DE RAVUSSIN, E.; SMITH, S. R. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 1844–1848, 2004.

HENRIKSEN, E. J.; BOUREY, R.; RODNICK, K. J., KORANYI, L.; PERMUTT, M. A.; HOLLOSZY, J. O. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p.593-598, 1990.

HERRMANN T. S.; BEAN, M. L.; BLACK, T. M.; WANG, P.; COLEMAN, R. A. High glycemic index carbohydrate diet alters the diurnal rhythm of leptin but not insulin concentrations. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 226, p. 1037–1044, 2001.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDAVARI, A.; MURRAY, D.; SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 1543–1549, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87–91, 1993.

HOUMARD, J. A.; COX, J. H.; MACLEAN, P. S.; BARAKAT, H. A. Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. **Metabolism**, v. 49, p. 858–861, 2000.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 10697–10703, 1996.

HULVER, M. W.; ZHENG, D.; TANNER, C. J.; HOUMARD, J. A.; KRAUS, W. E.; SLENTZ, C. A.; SINHA, M. K.; PORIES, W. J.; MACDONALD, K. G.; DOHM, G. L. Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 283, p. 861–865, 2002.

IMAGAWA, M.; TSUCHIYA, T.; NISHIHARA, T. Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 19, n. 254(2), p. 299–305, 1999.

JEFFREY, F. H.; KLEIN, S. Lipid metabolism during endurance exercise. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 558–563, 2000.

JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, n. 4, p. 247–56, 2001.

KERN, P. A.; RANGANATHAN, S.; LI, C.; WOOD, L.; RANGANATHAN, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, p. 745–751, 2001.

KERN, P. A.; DI GREGORIO, G. B.; LU, T.; RASSOULI, N.; RANGANATHAN, G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. **Diabetes**, v. 52, p. 1779–1785, 2003.

KIM, H. J.; HIGASHIMORI, T.; PARK, S. Y.; CHOI, H.; DONG, J.; KIM, Y. J.; NOH, H. L.; CHO, Y. R.; CLINE, G.; KIM, Y. B.; KIM, J. K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. **Diabetes**, v. 53, p. 1060–1067, 2004.

KIMURA, S.; NAGAI, R.; KAHN, B. B.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1288–1295, 2002.

KIRKLAND, J. L.; HOLLENBERG, C. H.; KINDLER, S.; GILLON, W. S. Effects of age and anatomic site on preadipocyte number in rat fat depots. **J. Gerontol.**, v. 49, p. 31–5, 1994.

KOVRT, W. M.; LANDT, M.; BIRGE, S. J. J. R. Serum leptin levels are reduced in response to exercise training, but not hormone replacement therapy, in older women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 3980–3985, 1996.

KRAUS, W. E.; SLENTZ, C. A. Exercise training, lipid regulation, and insulin action: a tangled web of cause and effect. **Obesity. (Silver Spring)**, v. 17, s. 3, p. 21-6, 2009.

LAKKA, T. A.; LAAKSONEM, D. E.; LAAKA, H. M.; MÄNNIKÖ, N.; NISKANEN, L. K.; RAUMRAMAA, R. Sedentary life style, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 35, p. 1279-86, 2003.

LEE, J. H.; CHAN, J. L.; YIANNAKOURIS, N.; KONTOGIANNI, M.; ESTRADA, E.; SEIP, R.; ORLOVA, C.; MANTZOROS, C. S. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 4848–4856, 2003.

LYNGSO, D.; SIMONSEN, L.; BULOW, J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. **J. Physiol.**, v. 543, p. 373–378, 2002.

MAGANA, M. M.; KOO, S. H.; TOWLE, H. C.; OSBORNE, T. F. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 18, n. 7, p. 4726-33, 2000 Feb.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fisiologia do Exercício., 4ª ed, local: Rio de Janeiro, Ed. **Guanabara Koogan**, 1998.

MENDOZA-NUNEZ, V. M.; GARCIA-SANCHEZ, A.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, M.; GALVAN-DUARTE, R. E.; FONSECA-YERENA, M. E. Overweight, waist circumference, age, gender, and insulin resistance as risk factors for hyperleptinemia. **Obes. Res.**, v. 10, p. 253–259, 2002.

MINOKOSHI, Y.; KIM, Y. B.; PERONI, O. D.; FRYER, L. G.; MULLER, C.; CARLING, D.; KAHN, B. B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, p. 339–343, 2002.

MINOKOSHI, Y.; KAHN, B. B. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 196–201, 2003.

MOLLER, D. E.; KAUFMAN, K. D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annu. Rev. Med.**, 2004.

MOUSTAID, N.; LASNIER, F.; HAINQUE, B.; QUIGNARD-BOULANGE, A.; PAIRAULT, J. Analysis of gene expression during adipogenesis in 3T3-F442A preadipocytes: insulin and dexamethasone control. **J. Cell Biochem.**, v. 42, n. 4, p. 243-54, 1990.

NAKAE, J.; KITAMURA, T.; KITAMURA, Y.; BIGGS, W. H.; ARDEN, K. C.; ACCILI, D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. **Dev. Cell.**, v. 4, n. 1, p. 119 – 129, 2003.

NEUBAUER, O.; REICHHOLD, S.; NERSESYAN, A.; KÖNIG, D.; WAGNER, K.H. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses? **Exerc. Immunol. Rev.**, v. 14, p. 51-72, 2008.

NTAMBI, J. M.; KIM, Y. C. Adipocyte differentiation and gene expression. **J. Nutr.**, v. 130, p. 3122S-3126S, 2000.

OFEI, F.; HUREL, S.; NEWKIRK, J.; SOPWITH, M.; TAYLOR, R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 45, p. 881–885, 1996.

OSCAI, L. B.; CARUSO, R. A.; WERGELES, A. C.; PALMER, W. K. 1981. Exercise and the cAMP system in rat adipose tissue. I. Lipid mobilization. **J. Appl. Physiol.**, v. 50, p. 250-254.

OSCAI, L. B.; SPIRAKIS, C. N.; WOLFF, C. A.; BECK, R. J. Effects of exercise and of food restriction on adipose tissue cellularity. **J. Lipid. Res.**, v. 13, n. 5, P. 588-92, 1972.

OSTROWSKI, K.; HERMANN, C.; BANGASH, A.; SCHJERLING, P.; NIELSEN, J. N.; PEDERSEN, B. K. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **J. Physiol.**, v. 513, p. 889–894, 1998.

PAJVANI, U. B.; DU, X.; COMBS, T. P.; BERG, A. H.; RAJALA, M. W.; SCHULTHESS, T.; ENGEL, J.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P. E. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 9073–9085, 2003.

PAJVANI, U.B.; HAWKINS, M.; COMBS, T. P.; RAJALA, M. W.; DOEBBER, T.; BERGER, J. P.; WAGNER, J. A.; WU, M.; KNOPPS, A.; XIANG, A. H.; UTZSCHNEIDER, K. M.; KAHN, S. E.; OLEFSKY, J. M.; BUCHANAN, T. A.; SCHERER, P. E. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 12152–12162, 2004.

PAZ-PIEL, I.; CAI, D. H.; WANG, D.; KOWALSKI, J.; BLACKFORD, A.; LIU, H.; HECKMAN, C. A.; GOMBART, A. F.; KOEFFLER, H. P.; BOXER, L. M.; FRIEDMAN, A. D. CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBPalpha myeloid oncoproteins induce bcl-2 via interaction of their basic regions with nuclear factor-kappaB p50. **Mol. Cancer Res.**, v. 3, n. 10, p. 585-596, 2005.

PETIBOIS, C.; CASSAIGNE, A.; GIN, H.; DÉLÉRIS, G. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance trained-subjects. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 3377–84, 2004.

PRUNET-MARCASSUS, B.; COUSIN, B.; CATON, D.; ANDRÉ, M.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific difference. **Exp. Cell Res.**, v. 1, n. 312(6), p. 727-36, 2006.

RACETTE, S. B.; COPPACK, S. W.; LANDT, M.; KLEIN, S. Leptin production during moderate-intensity aerobic exercise. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 2275–2277, 1997.

REUSCH, J. E.; COLTON, L. A.; KLEMM, D. J. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 1008–1020, 2000.

RIBEIRO BRAGA, L.; DE MELLO, M. A.; GOBATO, C. A. Continuous and intermittent exercise: effects of training and detraining on body fat in obese rats. **Arch. Latino Am. Nutr.**, v. 54, n. 1, p. 58-65, 2004.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipids. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 375-80, 1964.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.16, p. 145-71, 2000, review.

SAAD, M.F.; RIAD-GABRIEL, M.G.; KHAN, A.; SHARMA, A.; MICHAEL, R.; JINAGOUDA, S.D.; BOYADJIAN, R.; STEIL, G. M. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 453–459, 1998

SALTIN, B.; ROWELL, L. B. Functional adaptations to physical activity and inactivity. **Fed. Proc.**, v. 39, n. 5, p. 1506-13, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold. Spring Harbor. Press**, v.1, 2, 3. 1989.

SELVARAJAN, S.; LUND, L. R.; TAKEUCHI, T.; CRAIK, C. S.; WERB, Z. A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 267–275, 2001.

SHEPHERD, P. R.; GNUDI, L.; TOZZO, E.; YANG, H.; LEACH, F.; KAHN, B. B. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 22243–22246, 1993.

SMAS, C. M.; SUL, H. S.; Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. **Cell**, V. 21, n. 73(4), p. 725-34, 1993.

SHEPARD, T. Y.; WEIL, K. M.; SHARP, T. A.; GRUNWALD, G. K.; BELL, M. L.; HILL, J. O. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 703-8, 2001.

SCHUTTE, H.; LOHMEYER, R. J.; ROSSEAU, S.; ZIEGLER, S.; SIEBERT, C.; KIELISCH, H.; PRALLE, H.; GRIMMINGER, F.; MORR, H.; SEEGER, W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic lung edema. **Eur. Respir. J.**, v. 9, p. 1858-1867, 1996.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control and food intake. **Nature**, v. 404, p. 661 – 71, 2000.

SMAS, C. M.; SUL, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. **Cell.**, v. 73, n. 4, p. 725-34, 1993.

SOUFI, F. G.; FARAJNIA, S.; ASLANABADI, N.; AHMADIASL, N.; ALIPOUR, M.; ALIPOUR, M.; DOUSTAR, Y.; ABDOLALIZADEH, J.; SHEIKHZADEH, F. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 27, n. 4, p. 263-70, 2008.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MOHLIG, M.; BERGMANN, M. M.; RISTOW, M.; BOEING, H.; PFEIFFER, A. F. Adiponectin and protection against Type 2 diabetes mellitus. **Lancet.**, v. 361, p. 226–228, 2003.

STALLKNECHT, B.; ANDERSEN, P. H.; VINTEN, J.; BENDTSEN, L. L.; SIBBERSEN, J.; PEDERSEN, O.; GALBO, H. Effect of physical training on glucose transporter protein and mRNA levels in rat adipocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 1, p. 128-34, Jul., 1993.

STASIULIS, A.; MOCKIENE, A.; VIZBARAITE, D.; MOCKUS, P. Aerobic exercise-induced changes in body composition and blood lipids in young women. **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 2, p. 129-34, 2010.

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The Epidemic of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 89, n. 6, p. 2522-2525, 2002.

STEPHENS, J. M.; LEE, J.; PILCH, P. F. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 10, n. 272(2), p. 971-6, 1997.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307–312, 2001.

SUTHERLAND, L. N.; BOMHOF, M. R.; CAPOZZI, L. C.; BASARABA, S. A.; WRIGHT, D. C. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. **J. Physiol.**, v. 587, p. 1607–1617, 2009.

TONG, Q.; DALGIN, G.; XU, H.; TING, C. N.; LEIDEN, J. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, v. 290, p. 134–138, 2000.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 30, n. 79(7), p. 1147-56, 1994.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 2, p. 158-168, 2008.

VIONNET, N.; HANI, E. L. H.; DUPONT, S.; GALLINA, S.; FRANCKE, S.; DOTTE, S.; DE MATOS, F.; DURAND, E.; LEPRETRE, F.; LECOEUR, C.; GALLINA, P.; ZEKIRI, L.; DINA, C.; FROGUEL, P. Genomewide search for Type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a Type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 67, p. 1470–1480, 2000.

VITUG, A.; SCHNEIDER, S. H.; RUDERMAN, N. B. Exercise and type I diabetes mellitus. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 16, p. 285-304, 1998.

XU, H.; SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. **J. Biol. Chem.**, v. 10, n. 274(37), p. 26287-95. 1999.

WAGNER, R.; OBERSTE-BERGHAUS, C.; HERPERTZ, S.; BLUM, W. F.; PELZ, B.; HEBEBRAND, J.; SENF, W.; MANN, K.; ALBERS, N. Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. **Horm. Res.**, v. 54, p. 174–180, 2000.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; HARA, K.; MORI, Y.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; TSUBOYAMA-KASAOA, N.; EZAKI, O.; AKANUMA, Y.; GAVRILOVA, O.; VINSON, C.; REITMAN, M. L.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K.; YODA, M.; NAKANO, Y.; TOBE, K.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; TOMITA, M.; FROGUEL, P.; KADOWAKI, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat. Med.**, v. 7, p. 941–946, 2001.

YASARI, S.; DUFRESNE, E.; PRUD'HOMME, D.; LAVOIE, J. M. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. **Physiol. Behav.**, v. 91, n. 2-3, p. 281-89, 2007.

ZACHAROVA, J.; CHIASSON, J. L.; LAAKSO, M. The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to Type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. **Diabetes**, v. 54, p. 893–899, 2005.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN J.M.; Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425–432, 1994.

ANEXO A

Padronização do PCR semi-quantitativo

A: padronização do número de ciclos para reação amplificadora do cDNA do PPAR- γ no tecido adiposo periepididimal (PE). Da esquerda para a direita temos: 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 e 44 ciclos. Na primeira coluna temos o padrão de peso molecular de 100 pb. **B:** representação gráfica da quantificação das bandas obtidas.

A: padronização do número de ciclos para reação amplificadora do cDNA ADD1 no tecido periepididimal.

Da esquerda para a direita temos: 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41 e 44 ciclos. Na primeira coluna temos o padrão de peso molecular de 100 pb. **B:** representação gráfica da quantificação das bandas obtidas.

A: padronização do número de ciclos para reação amplificadora do cDNA do RPL no tecido adiposo periepididimal (PE). Da esquerda para a direita temos: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 e 34 ciclos. Na última coluna temos o padrão de peso molecular de 100 pb. **B:** representação gráfica da quantificação das bandas obtidas.

A: padronização do número de ciclos para reação amplificadora do cDNA do C/EBP α no periepididimal (PE).

Da esquerda para a direita temos: 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 ciclos. Na primeira coluna temos o padrão de peso molecular de 100 pb. B: representação gráfica da quantificação das bandas obtidas.

ANEXO B

Padronização da reação de PCR-Real Time

$$\text{Eficiência} = \text{POTÊNCIA}(10; -1/-3,2988) = 2,009743$$

Eficiência da Adiponectina PE

$$\text{Eficiência} = \text{POTÊNCIA}(10; -1/-3,344) = 1,9908$$

Eficiência do PREF-1 PE

$$\text{Eficiência} = \text{POTÊNCIA}(10;-1/-3,290) = 2,01337$$

Eficiência do PPAR gama PE

$$\text{Eficiência} = \text{POTÊNCIA}(10;-1/-3,317) = 2,0020$$

Eficiência β_2M

ANEXO C

Determinação do gene constitutivo a ser utilizado para normalização das reações de PCR-

Real Time

1,5	B2M	ActX	Hprt1	HMB	Normalisation Factor
1	2,16E-01	1,57E-01	2,12E-01	7,37E-01	0,6212
2	2,16E-01	1,66E-01	9,02E-02	1,00E+00	0,5493
3	5,66E-01	5,63E-01	4,38E-01	9,46E-01	1,3881
4	4,57E-01	5,36E-01	5,43E-01	9,66E-01	1,3785
5	4,18E-01	5,95E-01	6,64E-01	1,91E-01	0,9697
6	2,91E-01	4,15E-01	4,06E-01	1,11E-01	0,6255
7	6,83E-01	9,01E-01	6,20E-01	3,56E-01	1,3978
8	5,11E-01	6,83E-01	5,63E-01	9,66E-01	1,5190
9	2,70E-01	3,23E-01	7,80E-02	1,86E-01	0,4340
10	1,56E-01	1,70E-01	5,43E-01	8,90E-02	0,4355
11	7,22E-01	7,68E-01	8,35E-01	3,39E-01	1,4496
12	7,79E-01	7,42E-01	8,41E-01	7,79E-01	1,8064
13	7,68E-01	8,59E-01	8,77E-01	8,59E-01	1,9327
14	8,12E-01	7,79E-01	4,83E-01	7,42E-01	1,5890
15	4,80E-01	3,39E-01	1,76E-01	7,68E-01	0,8862
16	1,39E-01	8,90E-02	5,11E-01	1,70E-01	0,4163
17	2,93E-01	1,86E-01	8,71E-01	3,23E-01	0,8098
18	1,00E+00	9,66E-01	4,48E-01	6,83E-01	1,6972
19	4,73E-01	3,56E-01	9,74E-02	9,01E-01	0,8028
20	1,30E-01	1,11E-01	2,91E-01	4,15E-01	0,4708
21	2,33E-01	1,91E-01	9,40E-01	5,95E-01	0,9142
22	8,59E-01	9,66E-01	8,83E-01	5,36E-01	1,8222
23	7,42E-01	9,46E-01	1,00E+00	5,63E-01	1,8253
24	7,79E-01	1,00E+00	5,82E-01	1,66E-01	1,2063
25	5,00E-01	7,37E-01	8,80E-01	1,68E-01	1,1131
M < 1,5	0,881	0,992	1,325	1,405	

ANEXO D

Planilha de treinamento

1a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,3	2	10 min
		2	0,4	2	
		3	0,5	4	
		4	0,3	2	
terça		1	0,3	2	15 min
		2	0,4	3	
		3	0,5	8	
		4	0,3	2	
quarta		1	0,3	2	20 min
		2	0,4	4	
		3	0,5	10	
		4	0,3	4	
quinta		1	0,3	2	25 min
		2	0,4	4	
		3	0,5	14	
		4	0,3	5	
sexta		1	0,3	2	25 min
		2	0,4	4	
		3	0,5	14	
		4	0,3	5	
2a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,3	2	25 min
		2	0,4	4	
		3	0,5	14	
		4	0,3	5	
terça		1	0,2	2	30 min
		2	0,4	3	
		3	0,5	10	
		4	0,6	10	
		5	0,3	5	
quarta		1	0,3	2	30 min
		2	0,4	3	
		4	0,5	7	
		5	0,6	13	
		5	0,3	5	
quinta		1	0,4	2	35 min
		2	0,5	8	
		3	0,6	20	
		4	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	35 min
		2	0,5	13	
		3	0,6	15	

		4	0,4	5	
3a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	30 min
		2	0,5	8	
		3	0,6	15	
		4	0,4	5	
terça		1	0,4	3	38 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	20	
		4	0,5	10	
		5	0,4	2	
quarta		1	0,4	2	35
		2	0,5	8	
		3	0,6	20	
		4	0,4	5	
quinta		1	0,4	3	45 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	25	
		4	0,5	10	
		5	0,4	4	
sexta		1	0,4	2	45 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	20	
		4	0,5	20	
		5	0,4	5	
4a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	3	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	20	
		4	0,5	10	
		5	0,4	2	
		6	0,3	2	
terça		1	0,4	3	45 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	25	
		4	0,5	10	
		5	0,4	2	
		6	0,3	2	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	20	
		4	0,5	20	
		5	0,5	5	
quinta		1	0,3	2	60 min
		2	0,4	3	
		3	0,5	5	
		4	0,6	15	

		5	0,7	30	
		6	0,4	5	
sexta		1	0,3	2	60 min
		2	0,4	3	
		3	0,5	5	
		4	0,6	15	
		5	0,7	30	
		6	0,4	5	
5a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,3	2	40 min
		2	0,4	3	
		3	0,5	5	
		4	0,6	7	
		5	0,7	20	
		6	0,4	3	
terça		1	0,3	2	60 imn
		2	0,4	3	
		3	0,5	5	
		4	0,7	20	
		5	0,8	25	
		6	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	10	
		4	0,7	10	
		5	0,8	10	
		6	0,3	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,5	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	30	
		6	0,3	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,9	10	
		7	0,4	5	
6a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	7	
		5	0,8	20	
		6	0,4	3	

terça		1	0,4	2	60 imn
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	0,9	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,7	10	
		4	0,8	15	
		5	0,6	5	
		6	0,9	20	
		7	0,5	5	
7a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	7	
		5	0,8	20	
		6	0,4	3	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	

quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	0,9	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,7	10	
		4	0,8	15	
		5	0,6	5	
		6	0,9	20	
		7	0,5	5	
8a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	15	
		6	0,4	5	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	1	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,8	15	
		4	0,9	15	
		5	0,8	20	

		6	1,1	10	
		7	0,4	5	
9a.		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
Semana					
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	15	
		6	0,4	5	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	1	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,8	15	
		4	0,9	15	
		5	0,8	20	
		6	1,1	10	
		7	0,4	5	
10a.		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
Semana					
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	15	
		6	0,4	5	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	

		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	1	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,8	15	
		4	0,9	15	
		5	0,8	20	
		6	1,1	10	
		7	0,4	5	
11a.		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	15	
		6	0,4	5	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	

		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	1	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,8	15	
		4	0,9	15	
		5	0,8	20	
		6	1,1	10	
		7	0,4	5	
12a. Semana		Estágio	Velocidade	Tempo	Observações
segunda		1	0,4	2	40 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	15	
		6	0,4	5	
terça		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	10	
		5	0,8	20	
		6	0,9	15	
		7	0,4	5	
quarta		1	0,4	2	50 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	15	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
quinta		1	0,4	2	60 min
		2	0,5	3	
		3	0,6	5	
		4	0,7	5	
		5	0,8	20	
		6	0,5	5	
		7	1	15	
		8	0,4	5	
sexta		1	0,4	2	60 min
		2	0,6	3	
		3	0,8	15	
		4	0,9	15	
		5	0,8	20	
		6	1,1	10	
		7	0,4	5	