ARNALDO HENRIQUE DE SOUZA

METABOLISMO DE GLICOSE NO TECIDO ADIPOSO: EFEITOS DO TREINAMENTO E DESTREINAMENTO FÍSICO EM ADIPÓCITOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2011

ARNALDO HENRIQUE DE SOUZA

METABOLISMO DE GLICOSE NO TECIDO ADIPOSO: EFEITOS DO TREINAMENTO E DESTREINAMENTO FÍSICO EM ADIPÓCITOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima
Versão Original

São Paulo
2011

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

Souza, Arnaldo Henrique de.
Metabolismo de glicose no tecido adiposo branco:efeitos do treinamento e destreinamento em adipócitos isolados / Arnaldo Henrique de Souza. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Fabio Bessa Lima.

Dissertação (Mestrado) – 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: Glucose metabolism in adipose tissue:effects of physical training and detraining in isolated adipocytes

Descritores: 1. Metabolismo 2. Tecido adiposo 3. Exercício físico 4. Treinamento aeróbico 5. Glicose 6. Insulina I. Lima, Fabio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0154/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Arnaldo Henrique de Souza.

Título da Dissertação: Metabolismo de glicose no tecido adiposo: efeitos do treinamento e destreinamento físico em adipócitos isolados.

Orientador(a): Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição : .....

Presidente: nome completo: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **127** nas fls. **76** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Fabio Bessa Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Repercussões do destreinamento físico sobre a ingestão calórica, peso corporal, no metabolismo do adipócito e nos fatores de transcrição responsáveis pela adipogênese em ratos wistar machos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Arnaldo Henrique de Souza, Ariclécio Cunha de Oliveira, Amanda Baron Campaña, Natalie Carolina de Castro, Talita da Silva Mendes de Farias,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **22.09.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 23 de setembro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a **DEUS**, por sua infinita bondade e pela presença marcante que fortalece e conforta.

A minha família, por ter me apoiado, aconselhado, pelo incentivo e confiança nas minhas decisões.

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) que possibilitaram a realização deste projeto com toda a infra-estrutura física e pessoal.

Ao Fabio Bessa Lima, por ter me recebido de braços abertos como aluno e pela paciência em ensinar e também ouvir.

À Solange, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e pelo apoio no ingresso à carreira acadêmica.

Ao pessoal de Maringá: Elizete, João, Léo, Maeda, Jean, Bruno, Marlon, Kami, Marcos e Vinícius pelo incentivo e amizade de vocês.

Aos meus grandes amigos Léo e Ari, pelo companheirismo, sugestões, respeito, simplicidade, pelo exemplo de dedicação e seriedade, pelo apoio indispensável na realização deste trabalho e pelas conversas científicas e não científicas. À Sandra, pelo carinho e apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: André, Pati, Talita, Andressa, Amanda, Rogério, Renan, Bél, Carol e Natalie, pelo companheirismo, auxilio e pela companhia na bancada, almoços, jantares, pizzas e bares.

A todos os colegas da USP e do ICB, pela amizade, idéias, informações e pelo convívio agradável dentro e fora dos corredores. Ao Carlos e Emídio, que dividiram espaço comigo, pela paciência, convívio, companheirismo e amizade.

Ao pessoal da kit Sbaraí: Marcella, Mari, Felipe, Rodrigo e todos que moraram no “quadrado branco”. Aprendi muito com vocês sobre convivência, amizade e ciência.

Aos funcionários que sempre auxiliaram no biotério: Vilson, Bob, Maria, Miguel e Cláudio, pelo apoio técnico de extrema qualidade, seriedade e simpatia nos corredores. Aos funcionários da biblioteca, pela paciência, profissionalismo e todo o apoio na formatação desta dissertação.

Aos professores da USP, em especial do departamento de Fisiologia, que colaboraram para a minha formação acadêmica e por transmitirem suas experiências didáticas e científicas.

Aos secretários Paloma e Zé Maria, pela competência, profissionalismo e por todo apoio nos trâmites administrativos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a minha formação e realização deste estudo.

À FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro.

O meu OBRIGADO!!!

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem diga nem todas, só as de verão. Mas no fundo isso não tem importância. O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos. Sonhos que um homem sonha sempre. Em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado”

William Shakespeare

RESUMO

SOUZA, A. H. Metabolismo de glicose no tecido adiposo: efeitos do treinamento e destreinamento físico em adipócitos isolados. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Biofísica) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

O objetivo deste estudo foi averiguar se o metabolismo do tecido adiposo branco (TAB) de animais treinados sofre total reversibilidade em um longo período de destreinamento. Para isso foram utilizados ratos machos Wistar, distribuídos em dois grupos: treinado (T) e sedentário (S). Após 8 semanas de treinamento em esteira rolante, o grupo treinado foi redistribuído em dois outros subgrupos: animais que permaneceram treinando por mais 8 semanas (T), e animais que interromperam o treinamento por 8 semanas –grupo destreinado (D). Ao final do protocolo experimental (16 semanas) os animais foram sacrificados, o sangue coletado para dosagens plasmáticas (insulina, glicose, testosterona, triacilgliceróis –TAG e colesterol total), e as células do coxim adiposo periepididimal (PE), isoladas para realização de ensaios biológicos (captação de 2-desoxi-D-glicose, incorporação de ^{14}C-glicose e ^{14}C-lactato em triacilglicerol e conversão de ^{14}C-glicose a CO^2 e lipólise), determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e cálculo de celularidade do tecido. Ao longo do período experimental, observamos que não houve diferenças no consumo alimentar, hídrico e no peso corporal final dos animais. A resposta ao treinamento físico foi constatada a partir da avaliação da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo. O grupo T apresentou redução de massa e diâmetro das células dos coxins adiposos subcutâneio (SC), PE e retroperitonial (RP) em relação aos demais grupos (S e D), embora a celularidade apresentou-se semelhante entre os três grupos. Verificamos que 8 semanas de destreino (grupo D) resultou em um quadro de resistência à insulina, representado pelo aumento de insulina plasmática e pelo índice de $HOMA_{IR}$, em relação aos demais grupos (S e T). A captação de 2-desoxi-D-glicose, não apresentou diferença na situação basal, porém, quando os adipócitos foram estimulados com insulina, o grupo D apresentou uma menor resposta em relação ao grupo S. Os adipócitos de animais destreinados (grupo D) apresentaram maior capacidade de conversão de glicose a CO_2, quando comparado ao grupo S. Com relação à capacidade de incorporação da glicose em TAG, não houve diferenças na situação basal, contudo, os animais treinados apresentaram menor resposta quando as células foram estimuladas com insulina. Não houve diferença entre os grupos na incorporação de lactato em TAG. O destreinamento promoveu aumento na incorporação de glicose em ácidos graxos (AG) quando comparados aos animais treinados, tanto na presença, quanto ausência de insulina. Por outro lado, a atividade das enzimas lipogências (ácido graxo sintase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, enzima málica e ATP-citrato liase) não apresentaram diferenças entre os três grupos. Verificou-se também, que aproximadamente 80% da glicose

incorporada em TAG ocorreu via glicerol em todos os grupos de animais. Com relação à hidrólise dos TAG, não foi verificado diferença entre os grupos na capacidade lipolítica (tanto basal quanto maximamente estimulada por isoproterenol). Em suma, estes dados sugerem que a capacidade lipogênica do TAB sofre reversibilidade no destreino, ou seja, aumenta em relação ao estado treinado, se igualando ao estado sedentário. Além disso, um quadro de resistência periférica à insulina é observado com a descontinuidade do treinamento físico. Nossos achados descartam a hipótese de que haveria aumento de massa adiposa após 8 semanas de destreino em relação ao estado sedentário, e ainda, sugerem a ausência de um incremento no número de adipócitos no TAB de animais destreinados.

Palavras-chave: Metabolismo. Tecido Adiposo. Exercício Físico. Treinamento. Destreinamento.

ABSTRACT

SOUZA, A. H. Glucose metabolism in adipose tissue: effects of physical training and detraining in isolated adipocytes. 2011. 80 p. Master thesis (Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2011.

The objective of the present study was to determine whether the metabolism of white adipose tissue (WAT) of trained animals suffers total reversibility in a long term detraining period. For this purpose, male Wistar rats were divided at random into two groups: trained (T) and sedentary (S). After 8 weeks of treadmill running training, trained group was subdivided into two other subgroups: animals that trained for another 8 weeks (T), and animals who stopped training for 8 weeks (detrained group -D). At the end of the experimental protocol (16 weeks) animals were sacrificed and, trunk blood was collected for insulin, glucose, testosterone, triglycerides, total cholesterol and TG determinations; periepididymal fat pad was processed for adipocyte isolation and then 2-deoxy-D-glucose uptake, incorporation of 14C-glucose and lactate into triacylglycerol, the conversion of 14C-glucose into CO2 and lipolysis, the activity of enzymes involved in carbohydrate metabolism and tissue cellularity were performed. Throughout training period, it was not observed differences in food and water consumption, and final body weight. Physical training was evaluated by citrate synthase activity in soleus muscle. Group T showed a reduction in mass and diameter of cells from subcutaneous (SC), PE and retroperitoneal (RP) fat pads comparing to other groups (S and D), although the cellularity showed similar results on the three groups. It was observed that 8 weeks of detraining (group D) resulted in a state of insulin resistance, represented by the increase in plasma insulin and HOMAIR index, compared to other groups (S and T). The uptake of 2-deoxy-D-glucose showed no difference in baseline, however, when adipocytes were stimulated with insulin, group D presented a lower response than group S. Adipocytes from untrained animals (group D) showed higher capacity to convert glucose into CO2, compared to group S. Regarding to the capacity to incorporate glucose into TG, there were no differences at baseline, however, trained animals showed a lower response when cells were stimulated with insulin. There was no difference between groups in the incorporation of lactate in TG. Detraining

promoted an increase in the incorporation of glucose into fatty acids (FA) when compared to trained animals, both in presence and absence of insulin. On the other hand, the activity of lipogenic enzymes (fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme and ATP-citrate lyase) showed no differences between the three groups. It was also found that about 80% of the glucose incorporated into TG occurred via glycerol in all groups of animals. With respect to hydrolysis of TG, no difference was found among groups in the lipolytic capacity (both basal and maximally stimulated by isoproterenol). These data suggest that the lipogenic capacity of white adipose tissue is reversible during detraining, in other words, it increases in relation to training state equaling sedentary state. Besides, a state of peripheral insulin resistance is observed with detraining. Our findings discard the hypothesis that would be an increase in adipose mass after 8 weeks of detraining in relation to sedentary group, and more, suggest the absence of an increase in adipocyte numbers in white adipose tissue in detrained animals.

Key words: Metabolism. Adipose tissue. Exercise. Training. Detraining

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[3H]-2DG – [3H]-2 desoxiglicose

2-DG-6-P – 2-desoxiglicose-6-fosfato

ACC - acetil-CoA carboxilase

ACL - ATP citrato liase

ACS - acilCoA sintase

AG – Ácidos Graxos

AGL – Ácidos Graxos Livres

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AMPK – cinase protéica ativada pela 5'-adenosina monofosfato

AQP7 – Aquaporina 7

ATGL – Lipase de triacilglicerol do tecido adiposo

ATP – Adenosina trifosfato

C/EBPs - proteínas ligantes ao amplificador CCAAT

D - destreinado

DAG – Diacilglicerol

DGAT - diacilglicerol-fosfato aciltransferase

EM- enzima málica

EPM – Erro padrão da média

FABP – proteína para ligação com os ácidos graxos

FAS – Ácido graxo sintase

FAT/CD36 – ácido graxo translocase

FATP – proteína de transporte de ácidos graxos

FCmáx - freqüência cardíaca máxima

G3P – Glicerol-3-fosfato

G6PDH – glicose-6-fostato desidrogenase

GH – Hormônio do Crescimento

GLUT-4 - transportador de glicose isoforma 4

GLUT-4 – Transportador de glicose-4

GPAT - glicerol-fosfato aciltransferase

HDL-c – Lipoproteína de densidade alta

HSL – Lipase Hormônio Sensível

IL-6 – Interleucina-6

INS- insulina

Ip - intraperitoneal

IRS – Substrato do receptor de insulina

ISO – isoproterenol

LDN – Lipogênese de novo

LPL – Lipase de lipoproteína

MAG – Monoacilglicerol

MGAT - monoacilglicerol-fosfato aciltransferase

MGL – Lipase de monoacilglicerol

MO – Microscópio Óptico

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PAP - fosfatase de ácido fosfatídico

PE – Periepididimal

PGM – Fosfo-glico-mutase

PI3-cinase – Fosfatidil-inositol 3-cinase

PKA – Proteina cinase A

PPARg - receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

RP – Retroperitoneal

S – Sedentário

SC – Subcutâneo

SM – Síndrome Metabólica

SNC – Sistema nervoso central

SNS – Sistema nervoso simpático

SREBP-1c - proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis

T – Treinado

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo branco

TAG – Triacilglicerol

TNF-α – Fator α de necrose tumoral

VLDL – Lipoproteína de baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 O papel do tecido adiposo branco 17
1.2 O papel do treinamento físico aeróbio 21
1.3 Destreinamento físico 23
2 OBJETIVOS 27
2.1 Objetivos específicos 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 Animais 28
3.2 Procedimentos experimentais 28
3.3 Treinamento físico 29
3.3.1 Protocolo de treinamento 29
3.3.2 Período de adaptação 29
3.3.3 Teste de esforço 30
3.4 Destreinamento físico 30
3.5 Parâmetros avaliados após o sacrifício dos animais 30
3.5.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica 31
3.5.2 Teste de captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose em adipócitos isolados 31
3.5.3 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Lactato em lipídeos e oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$ em adipócitos isolados 32
3.5.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em ácidos graxos (AG) de triacilgliceróis (TAG) 33
3.5.5 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com Isoproterenol (ISO) 34
3.5.6 Determinação da atividade de enzimas lipogênicas 34
3.5.6.1 Atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) 35
3.5.6.2 Atividade da ácido graxo sintase (FAS) 35
3.5.6.3 Atividade da enzima málica (ME) 35
3.5.7 Atividade da enzima citrato sintase (CS) 36
3.5.8 Determinação da composição corporal 36
3.5.8.1 Lipídios 36
3.5.8.1 Massa magra 37
3.6 Dosagens bioquímicas e hormonais 37
3.6.1 Determinação de Glicose, Insulina, $HOMA_{IR}$ Triacilglicerol (TAG) e Colesterol Total 37
3.7 Análise Estatística 38
4 RESULTADOS 39

4.1 Peso e composição corporal 39
4.2 Consumo alimentar e ingestão de água 40
4.3 Dosagens bioquímicas 41
4.4 Dosagens hormonais 42
4.6 Avaliação do treinamento 44
4.7 Ensaios Biológicos 45
4.7.1 Avaliação da capacidade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol 45
4.7.2 Captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([^{3}H]-2DG) 45
4.7.3 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$ 46
4.7.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Lactato em lipídeos 47
4.7.5 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Ácidos Graxos de Triacilgliceróis 48
4.7.6 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis 49
4.8 Avaliação da atividade máxima de enzimas lipogênicas 49
5 DISCUSSÃO 52
5.1 Ensaios biológicos "*ex vivo*" 57
5.1.1 Capacidade lipolítica de adipócitos isolados 58
5.1.2 Captação, oxidação e incorporação de glicose em lipídios 59
6 CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS 70
Anexo A – tabelas de resultados 81
Anexo B – protocolo treinamento 83

1 INTRODUÇÃO

1.1 O papel do tecido adiposo branco

O tecido adiposo (TA) é um órgão dinâmico onde ocorrem vários processos bioquímicos. Os lipídios são macromoléculas hidrofóbicas que possuem funções estruturais (constituintes de membrana) e de armazenamento (fonte energética). Como fonte de armazenamento, os lipídeos encontram-se na forma de triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAG), que é a esterificação entre uma molécula de glicerol e três de ácidos graxos que ficam armazenados nos adipócitos. A biossíntese dos triglicerídeos é dependente de um conjunto de enzimas mais glicerol-3-fosfato e ácido graxo conjugado à coenzima A (CoA), provenientes da via glicolítica e de lipoproteínas circulatórias respectivamente (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GLISEZINSKI; LARROUY, 2009).

Vários organismos vivos são capazes de estocar o excesso de calorias ingeridas e ainda não aproveitadas, como lipídeos - TAG, proteínas e carboidratos (glicogênio). Os TAGs formam a reserva energeticamente mais eficiente, com teor calórico mais de duas vezes superior por grama em comparação com carboidratos (glicogênio) ou proteínas e com menor conteúdo de água (HILLGARTNER; SALATI; GOODRIDGE, 1995).

Os adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) armazenam TAG em uma única gota lipídica que ocupa o centro da célula, representando cerca de 85 a 90% da massa celular, e desloca o citoplasma, núcleo e outras organelas para a sua periferia. Eles podem variar enormemente em tamanho, podendo alterar seu diâmetro em até 20 vezes e seu volume em centenas a milhares de vezes. Além de adipócitos, o TAB possui uma matriz conjuntiva (colágeno e fibras reticulares), fibras nervosas, estroma vascular, nodos linfáticos, capilares, células imunes (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas não diferenciadas) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Os adipócitos possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos (AG) e estocar TAG durante períodos de abundância de suplemento energético e para mobilizá-los quando há déficit calórico. Nesses processos, o sistema nervoso central tem papel na regulação, via atividade neural direta, através

das divisões simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo, e indireta, através da liberação de insulina, regulando a lipólise e a lipogênese, respectivamente (PÉNICAUD et al., 2000; KREIER et al., 2002). O conteúdo de TAG armazenado no TAB é dependente do balanço entre sua velocidade de síntese (lipogênese) e sua velocidade de degradação (lipólise).

A lipogênese é a síntese de AGs esterificados que formam os TAG. O acúmulo de lipídeos no TAB depende da captação dos AGs circulantes provenientes da hidrólise enzimática do TAG que estão contidos nos quilomícrons e VLDL (very low density lipoprotein), realizada pela lipase de lipoproteínas (LPL) extracelular.

Após os AGs entrarem nos adipócitos, a re-esterificação é necessária para estocá-los em forma de TAG (ZECHNER et al., 2000). Para isso, algumas enzimas estão envolvidas, como por exemplo, a acilCoA sintase (ACS), a glicerol-fosfato aciltransferase (GPAT), a monoacilglicerol-fosfato aciltransferase (MGAT), a fosfatase de ácido fosfatídico (PAP) e a diacilglicerol-fosfato aciltransferase (DGAT).

Outras enzimas, como a AG sintase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e enzima málica (ME) são importantes para a síntese local de ácidos graxos.

A lipogênese de novo (DNL) é uma via integrante da lipogênese no TAB de ratos (FERRÉ; BAZIN, 2001), porém, em humanos, esta via é mais atuante no tecido hepático. A glicose é transportada para dentro da célula principalmente pelo transportador de glicose isoforma 4 (GLUT-4). A glicose permite a síntese dos substratos piruvato e glicerol-3-fosfato, os quais levam à síntese de TAG. O piruvato é usado para a formação de acetil-CoA e então transformado em malonil-CoA sob o controle da ACC. Além dela, outras enzimas participam desse processo, como a ATP citrato liase (ACL) que tem um papel chave (KOVACS; WESTERTERP-PLANTENGA, 2006). Além do mais, a via das pentoses produz NADPH (a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato [NADP]), que é usado durante a DNL (LEHNINGER, 1982).

A insulina é, provavelmente, o mais importante fator hormonal envolvido na regulação da lipogênese. Os efeitos da insulina são iniciados pela ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular, ativando tirosina quinase do seu receptor e

iniciando a sequência de reações da transdução do sinal, que culminará na síntese de lipídios. Na figura 1, podemos observar uma visão esquemática do metabolismo de glicose no TAB.

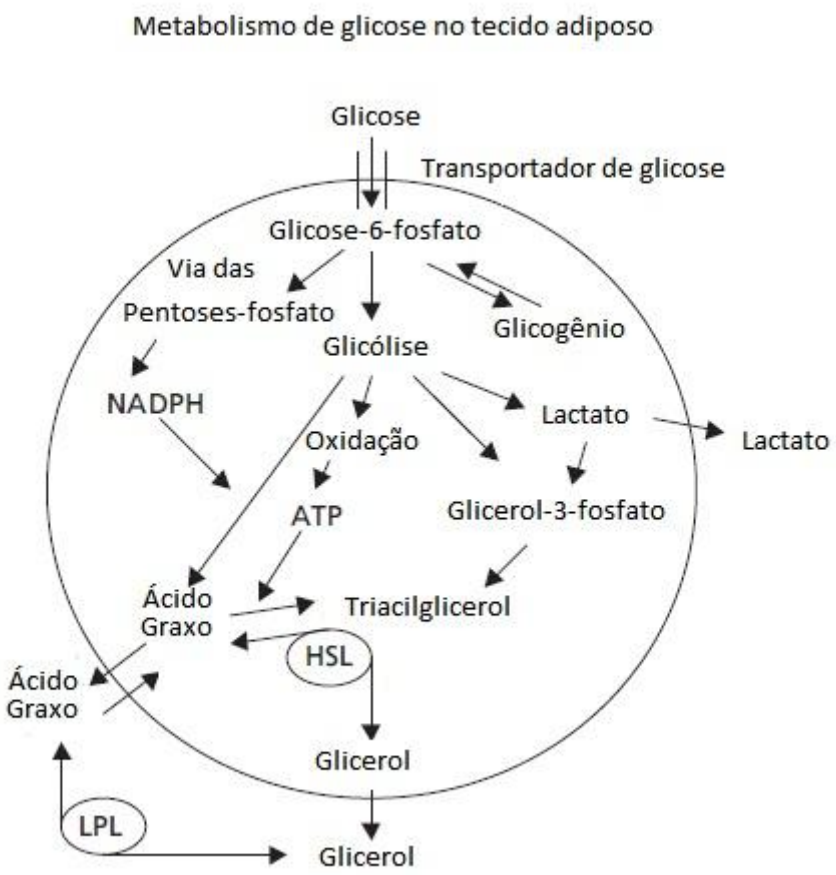

Figura 01. Visão esquemática do metabolismo de glicose no TAB.
FONTE: Adaptado de Stallknecht. 2004

Outra função metabólica do tecido adiposo é a hidrólise (lipólise) de triacilglicerol (TAG) e posterior liberação de ácidos graxos (AG) e glicerol. O AG livre é uma significativa fonte de energia química durante os períodos de maior demanda e é fundamental para a manutenção da homeostase energética. O nível circulante de catecolaminas é o principal estimulo hormonal da lipólise. As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) agem em β-adrenoceptores e estimulam a adenilato ciclase para produzir AMPc. A noradrenalina liberada das terminações nervosas simpáticas no TAB atua de forma semelhante. O AMPc estimula a lipólise pela ativação da enzima lipase hormônio-sensível (HSL). Outra enzima, a lipase de triglicerídeos de tecido adiposo (ATGL) também está envolvida, juntamente com HSL na primeira fase da lipólise, ambas catalisam a hidrólise da primeira ligação éster do TAG. Em seguida, o diacilglicerol (DAG) resultante é hidrolisado pela HSL

para gerar monoacilglicerol (MAG). Por fim, a hidrólise do MAG é realizada pela enzima lipase de monoacilglicerol (MGL), resultando na formação do glicerol livre (JAWORSI et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009). Não existe ainda uma evidência de que a MGL seja afetada por estimulação hormonal. Independente da participação de outras lipases, a ATGL e HSL são quantitativamente as mais importantes encontradas no tecido adiposo JAWORSI et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009). Nessa perspectiva, a liberação de glicerol dos adipócitos é muitas vezes tomada como uma medida da lipólise, porque o TA manifesta pouca ou nenhuma atividade da enzima glicerol quinase, necessária para aproveitamento do glicerol (COLEMAN et al., 2004).

Por um longo tempo, o adipócito foi considerado como uma célula, com funções limitadas, como por exemplo, o de garantir o estoque e a mobilização de TAG. Atualmente, tem-se destacado a propriedade do TAB de secretar substâncias, chamadas adipocinas, com importantes efeitos biológicos, isto é, de seu papel endócrino (AHIMA; FLIER, 2000; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; TRAYHURN; BEATTIE, 2001).

As adipocinas estão envolvidas em ações autócrinas, parácrinas e endócrinas e desempenham um papel importante na homeostasia energética (FANTUZZI, 2005; TRAYHURN; WOOD, 2005). Podem, por isso, ser agrupadas, de acordo com a principal ação, em adipocinas com função: 1) imunológica e inflamatória - interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e os fatores do complemento B, C3 e D (adipsina); 2) cardiovascular - angiotensinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1); 3) metabólica – adiponectina, resistina, visfatina; e, 4) endócrina – leptina, entre outros (COSTA; DUARTE, 2006).

O tamanho da massa adiposa é determinado pelo tamanho do adipócito (hipertrofia) e pelo seu número (hiperplasia), os quais dependem respectivamente do acúmulo de lipídeos dentro dos adipócitos, e da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), evento que correlaciona diretamente com o surgimento da obesidade (GREGOIRE et al., 1998; SHEPHERD et al., 1993). Os pré-adipócitos são linhagens celulares derivadas de células-tronco embrionárias multipotentes de origem mesodérmica (GESTA; TSENG; KAHN, 2007).

O processo de diferenciação envolve uma gama de fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPARγ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBPs) que desempenham um papel chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GESTA; TSENG; KAHN, 2007).

1.2 O papel do treinamento físico aeróbio

O exercício aeróbio é classificado como um exercício cíclico dinâmico e de intensidade inferior ao limiar anaeróbio ou limiar de lactato, que indica o ponto de transição da predominância do metabolismo aeróbio e anaeróbio (HOLLOWAY, 2009).

O exercício aeróbio se caracteriza por uma utilização de lipídios como fonte energética predominante. O exercício realizado em intensidades próximas de 60% a 70% do VO_2 máximo ou da frequência cardíaca máxima (FCmáx.) estimula a expressão da enzima quinase protéica dependente de AMP (AMPK). A AMPK tem papel fundamental no equilíbrio energético celular e atua como mediadora do metabolismo glicolítico e oxidativo (NORRBON et al., 2004; REBECCA et al., 2002; HOLLOWAY, 2009).

No tecido muscular o aumento das concentrações do AMPK acarreta em maior ação de enzimas como: (a) citrato sintase no ciclo de Krebs; (b) aumento na expressão da enzima Malonil-CoA descarboxilase; (c) diminuição da enzima Acetil-CoA carboxilase; (d) redução da enzima malonil-CoA desidrogenase. Esse último passo impede a ação da Carnitina Palmitoil Transferase 1 (CPT1 - enzima responsável pela transferência dos ácidos graxos acilados (grupo acilcarnitina) de cadeia longa para matriz mitocondrial) e sua oxidação (HOLLOWAY, 2009; NORRBON et al., 2004; FERRÉ; FOUFELLE, 2007)

Há algum tempo o treinamento físico (TF) é considerado por muitos pesquisadores como uma atividade que traz extensos benefícios para a saúde, como melhorias nos sistemas cardiorrespiratório e muscular, controle do peso corporal, além de melhorias em casos de hipertensão e diabetes (JEFFREY; KLEIN, 2000; WILMORE; COSTILL, 1999).

Sabe-se que o TF aumenta a sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal. Estudos indicam que o principal efeito do exercício nesse caso parece ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética (LUCIANO et al. 2002; O´DONOVAN et al., 2005; TERAN-GARCIA et al., 2005). Além disso, há claras indicações de que o exercício físico diminui a resistência à insulina no fígado e aumenta a sinalização e a captação de glicose nos adipócitos (RODNICK et al., 1987; PERES et al., 2005).

O papel da insulina sobre o aumento da captação de glicose ocorre principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina, ao se ligar ao sítio extracelular em seu receptor nas respectivas células, provoca uma fosforilação em tirosina da sua subunidade β e isto desencadeia uma sequência de eventos que culmina com a migração dos transportadores de glicose, GLUT-4, do citoplasma para a membrana celular. Esta translocação é determinante para que o GLUT-4 facilite a captação de glicose pela célula. Tanto a translocação de maior número de transportadores GLUT-4 quanto a sua maior atividade, levam a um aumento da eficiência da captação de glicose estimulada pela insulina (WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2006).

A prática do TF regular promove diminuição no tamanho dos adipócitos e os tornam mais responsivos à insulina e, além disso, ocorre também aumento na atividade de enzimas como, por exemplo, a lipase de lipoproteínas (LPL) (PERES et al., 2005; LAMBERT et al., 1994). Sabe-se que o exercício físico estimula a atividade da enzima lipase hormônio-sensível (HSL) e esta promove a hidrólise do triacilglicerol em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, que são liberados na corrente sanguínea onde servem diretamente como fonte de energia (AGL) ou como um precursor para a gliconeogênese (glicerol) (WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2006). Tal adaptação que ocorre no adipócito é extremamente importante para que indivíduos que praticam exercícios físicos, principalmente aqueles que o realizam diariamente (treinamento), não tenham um eventual dispêndio de energia (por exemplo, diminuição de glicose plasmática), ao mesmo tempo em que, mantêm um aporte energético para a musculatura esquelética. Entretanto, os efeitos induzidos pelo

exercício físico não permanecem por longos períodos e são revertidos num curto espaço de tempo após a cessação do treinamento (HOUMARD et al., 1993; ARCIERO; SMITH; CALLES-ESCANDON, 1998).

Embora os efeitos do TF sobre o tecido adiposo sejam bastante estudados, muito pouco se conhece sobre as repercussões do período seguinte ao cessar do treinamento sobre este tecido, tal fenômeno, será denominado neste trabalho como período de destreinamento.

1.3 Destreinamento físico

A perda das adaptações fisiológicas e de desempenho ocorre rapidamente quando uma pessoa encerra sua participação no exercício regular. Vários estudos demonstraram que os efeitos do TF são rapidamente revertidos com a sua diminuição ou completa interrupção, tanto seus efeitos musculares, cardiorrespiratórios e metabólicos, tal fenômeno é conhecido na área do TF e desportos por Reversibilidade (APPLEGATE; UPTON; STERN, 1984; COYLE et al., 1985; EVANGELISTA; BRUM, 1999; GOLLNICK et al., 1984; MADSEN et al., 1993; PETIBOIS et al., 2004; SJOGAARD, 1984; WILLIAMS; THOMPSON, 2006).

Segundo alguns autores, poucas semanas de destreinamento levam a uma redução na capacidade metabólica, sendo que, muitos dos aprimoramentos induzidos pelo treinamento são perdidos dentro de alguns meses (MUJIKA; PADILLA S, 2001). Coyle et al. (1985) verificou que, após 84 dias de destreino, as enzimas oxidativas apresentavam diminuições de aproximadamente 60% na sua atividade, ao passo que as glicolíticas apresentavam pequenas alterações, mostrando que a capacidade aeróbia diminuia mais rapidamente que a anaeróbia (COYLE et al., 1985).

Em outros estudos, apenas 2 semanas de destreino, atletas sofreram redução de 4-6% no VO_2 máx, e de 40-60% nas enzimas succinato desidrogenase e citocromo oxidase (COYLE et al., 1985; HOFFMAN, 2002). Foram observadas também diminuições na força e na hipertrofia da musculatura do atleta com apenas algumas semanas de destreino (COYLE et al., 1985; HOFFMAN, 2002).

Em um estudo de Evangelista e Brum (1999), os autores revisaram trabalhos

que avaliavam a reversibilidade de parâmetros fisiológicos modificados pelo TF, entre eles, a atividade de enzimas oxidativas musculares, inclusive a citrato sintase em humanos. Nesse aspecto, observou-se que, na maioria dos casos, apesar do declínio da atividade das enzimas ao longo do destreinamento físico, independentemente do tempo de destreino, os valores finais ainda eram superiores aos valores pré-treinamento (EVANGELISTA; BRUM, 1999). A magnitude e o tempo da perda dessas adaptações são dependentes dos antecedentes do treinamento realizado e do grupo muscular específico (WILMORE; COSTILL, 1999).

Sabe-se, que a cessação do TF leva a um aumento do peso corpóreo e a um rápido acréscimo da massa adiposa tanto em humanos, quanto em modelos animais (APPLEGATE; UPTON; STERN, 1984; ALMERAS et al., 1997; PAULI et al., 2007). De acordo com Applegate e Stern (1984), o destreinamento está associado com um aumento na ingestão de calorias diárias, especialmente em ratos geneticamente predispostos a obesidade (APPLEGATE; UPTON; STERN, 1984). Entretanto, outros pesquisadores sugerem que este acréscimo da massa adiposa está relacionado a um aumento na atividade lipogênica durante o período de destreinamento. Nesses estudos não foram constatadas diferenças na ingestão de calorias entre os grupos (LAMBERT et al., 1994; PAULI et al., 2007).

Além do mais, alguns trabalhos demonstraram que a cessação do TF leva a mudanças na sensibilidade à insulina, nos lipídeos plasmáticos e na composição corporal tanto em humanos quanto em modelos animais (ROGERS et al., 1990; LIU et al., 2008; ARCIERO; SMIT; CALLES-ESCANDON, 1998; KUMP; BOOTH, 2005).

No tecido muscular, tal adaptação parece estar associada a uma menor concentração de GLUT-4 (HOST et al., 1998), à diminuição na expressão do receptor de insulina (IR) e de sua fosforilação em tirosina, da fosforilação da AKT, além de redução da subunidade beta do receptor de insulina (IRβ) e da sua fosforilação (KUMP; BOOTH, 2005). Contudo, sabe-se que alterações na adiposidade também podem acarretar em complicações na homeostase glicêmica, como resistência à insulina e hiperglicemia (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

Dessa forma, se o metabolismo do adipócito sofre as consequências diretas do TF, presume-se que também deverá sofrer a sua reversibilidade com o

destreinamento. Simsolo et al. (1993) analisou a atividade da enzima LPL nos tecidos muscular e adiposo em atletas corredores, e como esperado, o destreino induziu uma rápida diminuição na atividade desta enzima no tecido muscular (reversibilidade), por outro lado, curiosamente, no tecido adiposo, os autores constataram um aumento na atividade da LPL, o que contribui para a disponibilização de lipoproteínas (AG) que podem ser incorporadas em TAG, favorecendo o acúmulo de lipídios neste tecido (SIMSOLO et al., 1993).

Em um estudo recente realizado em nosso laboratório, observamos que após 4 semanas de interrupção do treinamento, a gordura epididimal (PE) dos animais destreinados equiparou-se aos sedentários, apresentando uma velocidade de incremento de massa adiposa muito superior aos demais grupos (treinado e sedentário). Esse incremento se deu em parte, por aumento na ingestão alimentar e, pelo aumento na capacidade lipogênica dos adipócitos da região PE (SERTIÉ, 2010).

Atualmente, tem-se destacado a propriedade do TAB de secretar substâncias com importantes efeitos biológicos. Algumas citocinas pró-inflamatórias produzidas e secretadas pelos adipócitos induzem resistência à insulina. Dentre elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) correlaciona-se negativamente com o metabolismo da glicose (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; WARNE, 2003). Alguns estudos indicam que o destreinamento constitui um estímulo para o desenvolvimento da obesidade em humanos (SHEPARD et al., 2001; PETIBOIS et al., 2004), caracterizando-o com um estado de pré-obesidade (YASARI et al., 2007). Nessas circunstâncias, o rápido aumento da massa adiposa provocado pelo destreinamento pode favorecer a pré-disposição ao diabetes e até mesmo à obesidade.

Além do mais, sabe-se que o tecido adiposo está submetido a contínuo processo de remodelação (*turnover* celular), que normalmente mantêm a funcionalidade do tecido, mas que, em diferentes condições, este remodelamento pode levar a distúrbios metabólicos, como a resistência à insulina (LEE; WU; FRIED, 2010). Neste sentido, verificamos em nosso laboratório que a expressão gênica do PPARγ (importante fator de transcrição envolvido na adipogênese), e PREF-1 (marcador de pré-adipócitos), estavam aumentadas na fração do estroma vascular de animais treinados e destreinados (SERTIÉ, 2010). Curiosamente, apenas nos

animais destreinados verificou-se aumento na expressão de adiponectina, um marcador de adipócitos recém-diferenciados, no estroma vascular obtido de animais destreinados (SERTIÉ, 2010).

As pesquisas sobre o período de destreinamento e suas alterações metabólicas no adipócito ainda não estão bem esclarecidas e, além disso, não têm sido muito estudadas.

Assim, sabendo que a hipertrofia e a hiperplasia são as duas principais vias que levam ao aumento da massa adiposa total e, baseado em resultados anteriores de nosso grupo, a dúvida que nos coube foi há de que se o período de destreino (4 semanas) aumenta o número de adipócitos recém diferenciados no estroma vascular, o que ocorrerá com a massa, o volume e o metabolismo do TAB destes animais se o destreinamento se prolongar?

2 OBJETIVOS

O principal interesse deste trabalho foi de verificar se o metabolismo glicídico do tecido adiposo de animais treinados, sofre total reversibilidade em 8 semanas de destreinamento, com enfoque no tecido adiposo periepididimal.

2.1 Objetivos específicos

- Observar as alterações no peso corporal, ingestão hídrica e alimentar de ratos submetidos a 8 semanas de destreinamento após igual período de treinamento.
- Analisar parâmetros metabólicos em adipócitos isolados do tecido periepididimal de ratos destreinados: lipólise, lipogênese, captação e oxidação de glicose.
- Analisar a celularidade dos coxins adiposos subcutâneo, periepididimal e retroperitonial.
- Analisar atividade máxima de enzimas lipogênicas no tecido adiposo periepididimal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (certificado número 127).

Foram utilizados dois lotes de 15 ratos machos Wistar (6 semanas de idade) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram acondicionados em caixas coletivas de polipropileno (46x24x20cm com 1 animal/caixa), sob condições de temperatura ambiente controlada de 25±2 °C, ciclo invertido de iluminação escuro/claro 12/12h (período claro iniciando às 18h). Os animais receberam ração balanceada padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) (com composição seguindo as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA para alimentos de ratos de laboratório) e água *ad libitum.*

3.2 Procedimentos experimentais

Os animais, a partir da chegada ao biotério, foram subdivididos em dois grupos: treinado e sedentário, após um período, uma parte do grupo que realizava o treinamento físico, interrompeu-o, e assim o manteve até o fim do protocolo experimental, um grupo T (controle) foi mantido até o fim do protocolo experimental (totalizando 16 semanas de treinamento). O consumo (alimentar e hídrico) foi acompanhado 2 vezes/semana e a evolução do peso dos animais 1 vez/semana.

O protocolo experimental teve duração total de 16 semanas e o exercício utilizado foi corrida em esteira ergométrica. Ao final de 8 semanas de treinamento, os animais T foram subdivididos em dois grupos, totalizando três grupos experimentais: Treinado (T), Destreinado (D) e Sedentário (S). O grupo S foi o grupo controle, pareado por idade e que não realizou nenhum tipo de treinamento durante o protocolo experimental, permanecendo confinado ao espaço da caixa de polipropileno. Segue abaixo uma representação esquemática do *design* experimental:

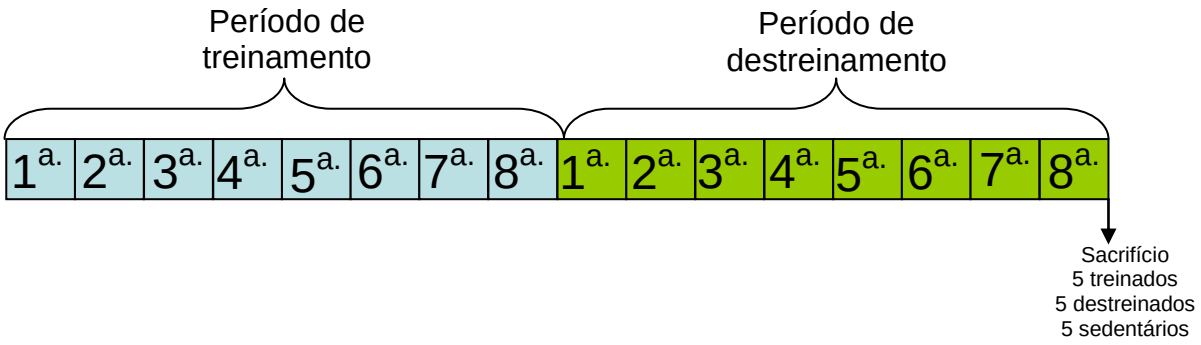

Figura 1.1 – Representação esquemática do desenho experimental

3.3 Treinamento físico

3.3.1 Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento consistiu de corridas em esteira ergométrica (IMBRAMED modelo KT3000), por até 60 minutos, cinco dias por semana (2x/semana, o tempo era reduzido entre 40-50min), durante 8 semanas, de acordo com protocolo estabelecido por Dufloth & Michelini (1992) (adaptado em nosso laboratório por PERES et al., 2005)(protocolo em ANEXO B). A esteira possuía velocidade programável e foi adaptada com 10 raias para o treinamento de 10 animais simultaneamente. As raias eram de acrílico transparente, pintadas em sua extremidade dianteira de preto, criando um ambiente para o qual os ratos são atraídos durante as sessões de treinamento. As sessões de exercícios foram realizadas entre 8h e 9h (ocorreram na fase noturna do ciclo dia/noite, horário em que a espécie é habitualmente mais ativa), precedida por um período de seleção-adaptação numa intensidade de 50-60% da capacidade máxima do animal.

3.3.2 Período de adaptação

No período de seleção-adaptação os animais foram selecionados por sua habilidade de andar/correr em velocidades variando entre 0,3 a 0,6 km/h em esteira, por cerca de 10 a 30 minutos (min.) por dia. Nenhum dos animais foi considerado inapto a andar/correr na esteira, desta maneira, não houve a necessidade de exclusão de animais. Os animais foram distribuídos em 3 grupos, (n=10 total final/grupo).

3.3.3 Teste de esforço

O protocolo de treinamento está padronizado em nosso laboratório (PERES et al., 2005). Dessa forma, realizamos um teste de esforço durante o período experimental (12 semanas de treinamento). O teste consistiu de incrementos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 min. iniciando-se com 0,3 km/h até o ponto em que o animal se recusou a correr. Os resultados foram utilizados para se ajustar a intensidade do treinamento no grupo treinado (50-60% da capacidade máxima).

3.4 Destreinamento físico

Os animais do grupo D realizaram o protocolo de treinamento, anteriormente citado (3.3.1), por 8 semanas, sendo que posteriormente foram privados do treinamento por um período de 8 semanas. Animais dos grupos S e T pareados por idade e tempo de observação foram utilizados como respectivos controles, sendo o grupo que continuou o TF por mais 8 semanas (protocolo em ANEXO B) .

3.5 Parâmetros avaliados após o sacrifício dos animais

Ao final de 16 semanas de treinamento (e 8 destreinamento) e após 48h da última sessão de exercício, todos animais foram mantidos em jejum de 12h e por volta 8h - 8h e 30min foram anestesiados (Tiopentax - 4 mg/100 g p.c. i.p.) e sacrificados por decapitação. Para retirada dos tecidos foi realizada a laparotomia mediana e em seguida foram removidos os tecidos adiposos periepididimal (PE), retroperitoneal (RP) e subcutâneo (SC) da região inguinal, e congelados à -80 °C para posteriores análises de expressões gênicas e protéicas, assim como amostras do músculo estriado *soleus* foi coletada para análise da atividade da enzima citrato sintase.

O coxim de gordura PE foi retirado para isolamento dos adipócitos e submetidos, *in vitro*, a testes biológicos para avaliação das taxas basais ou maximamente estimuladas por insulina de captação de [^{3}H]-2-desoxi-D-glicose ([^{3}H]-2DG), de oxidação de D-[U-^{14}C]-glicose e de incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose e [2-^{14}C]-lactato em lipídeos e determinação das taxas de lipólise basal e estimulada por isoproterenol. Os adipócitos passaram ainda por análises morfométricas, para determinação do volume.

3.5.1 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às condições laboratoriais para realização do estudo. Em resumo, o coxim periepididimal foi retirado, picado em finos fragmentos e incubados em tampão digestivo (DMEM/HEPES 20 mM/BSA 4%, colagenase II – Sigma - 1,0 mg/ml, pH=7,40) por cerca de 1 hora a 37 ^{o}C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EARLE/HEPES 20 mM/BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,4 e mantido a 37 ºC (tampão EHB). Logo após as células foram semeadas para os respectivos testes biológicos. Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico acoplado a câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 - MOTIC). Utilizou-se o programa Motic-Images Plus 2.0 para medição da área transversal celular, da qual obteve-se o raio celular médio (foram medidas 50 células/animal/tecido). A partir deste valor, assumindo-se que o adipócito isolado é esférico, foi calculado o volume, a área de superfície celular média e o número de células, conforme as fórmulas propostas por Fine e Girolamo (1997).

3.5.2 Teste de captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose em adipócitos isolados

As taxas de captação de [^{3}H]-2-desoxi-D-glicose ([^{3}H]-2DG) em adipócitos isolados foram mensuradas na ausência (basal) e na presença (de concentração maximamente estimulante, 10 nM) de insulina, afim de investigar a capacidade de transportar especificamente glicose para dentro da célula.

A [^{3}H]-2DG é captada pela célula e é transformada em 2-DG-6-P, porém a partir desta etapa, não é mais metabolizada, além de atuar como inibidor alostérico da enzima subseqüente da via glicolítica, a fosfo-glico-mutase (PGM), sendo assim, um importante marcador de transportador de glicose. Alíquotas de 40 μL de suspensão celular, foram pipetadas em tubos plásticos, contendo ou não 2 μL de insulina (concentração final de 10 nM) e incubadas por 15 min à 37 °C. Em seguida,

foram adicionados 10 μL de ^{3}H-2DG (concentração final de 0,4 mM e 1850 Bq/tubo) e, passados 3 min. exatos, o transporte foi interrompido com a adição de 250 μL de phloretin 0,6 mM (em E.H.B e DMSO 0,05%) a 4 ^{o}C. Para avaliação da captação, 200 μL da mistura final foram transferidos para tubos de microcentrífuga (0,4 mL) contendo 200 μL de óleo de silicone (densidade 0,963 g/mL) que foram centrifugados por 10 segundos em microcentrífuga (Microfuge E, Beckman Instruments Inc. Palo Alto, Calif.). A centrifugação teve como objetivo separar a mistura em três fases: uma superior, contendo células compactadas (agregado celular), uma intermediária correspondente ao óleo e a mais inferior constituída pelo tampão aquoso. Feito isso, foi recolhido o agregado celular mediante a secção do tubo com um estilete na altura da porção média da camada de óleo. Após a separação, a porção contendo o agregado celular foi transferida para um tubo contendo 2,5 mL de líquido de cintilação (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, Estados Unidos) e a radiação emitida aferida em contador beta (Micro Beta Trilux 1450LsC luminecense counter). Foi realizada uma determinação de incorporação inespecífica no agregado celular, onde se quantificou a radioatividade ali retida e que não foi captada pela célula. Esse valor foi subtraído do resultado obtido no final do teste. Isso garante que a contaminação presente no agregado celular não interfira no resultado da captação propriamente dito. Para a determinação da incorporação inespecífica, foram adicionados, primeiramente a suspensão celular (40 μL) em um tubo de ensaio e em seguida, o phloretin (inibidor do transporte de glicose), antes de se acrescentar [^{3}H]-2DG. Os resultados foram expressos em pmol/cm^{2} de superfície celular (representando quantidade de GLUT-4) e em nmol/10^{-6} células^{-1} (representado quantidade de células).

3.5.3 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Lactato em lipídeos e oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$ em adipócitos isolados

O objetivo deste teste é de avaliar a capacidade de adipócitos isolados em incorporar diferentes substratos (vias metabólicas distintas) em lipídios e o de metabolizar glicose.

Adipócitos (conc. final 30-40%) em tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA /glicose 1 mM, pH=7,4 a 37° C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-^{14}C]-

glicose (0,05 μCi/tubo), com ou sem insulina (10 nM). Estes tubos foram vedados com tampas de borracha. A seguir, os tubos foram enriquecidos de uma atmosfera com 95 % de O_2 5 % de CO_2 e incubados por 120 min em banho-maria a 37 ^oC. Ao término da incubação, 0,2 mL de H_2SO_4 (8N) foi pipetado sobre a mistura de reação e um flaconete com papel de filtro (2x4 cm embebido com 0,2 mL de etanolamina) foi emborcado (para adsorver o $^{14}CO_2$ liberado da reação). Incubou-se por mais 30 min., após isso, o flaconete foi preenchido com coquetel de cintilação biodegradável (Universol, ICN) para contagem da radioatividade beta incorporada (FINE; GIROLAMO, 1997; LIMA et al., 1994).

Em seguida, foi realizada a extração dos lípides mediante a adição de 2,5 mL de reativo de DOLE (isopropanol:n-heptano:H_2SO_4 8N, 4:1:0.25 v:v:v) no meio de incubação. Agitou-se a mistura por 4-5 vezes (sessões de 10 segundos) em vórtex durante 30 minutos. Ao final do período, foram adicionados 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e 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^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada (FRYN, 1992; BAZIN; FERRÉ, 2001). Os resultados foram expressos em nmol.10^{-6} células. h^{-1}.

3.5.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em ácidos graxos (AG) de triacilgliceróis (TAG)

Uma fração da glicose incorporada em lipídios é resultante da síntese de AG a partir de substratos glicídicos, processo denominado lipogênese *de novo*. A partir disso, este teste objetiva avaliar a fração de glicose incorporada em AG de TAG.

Da mistura composta por TAG previamente obtida no teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em lipídeos, foram retirados 500 µL, seguido por secagem completa utilizando-se N_2 gasoso. Após este processo, adicionou-se 1 mL de etanol (95%) e 250 µL de KOH (40%), os tubos de ensaio foram frouxamente tampados e colocados em banho-maria à 60 ^oC por 1 hora. Em seguida, o material foi resfriado a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. e, logo após, adicionou-se 2 mL de HCL (3N) e 2mL de n-heptano. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e

deixada em repouso por 10 min. Uma amostra de 500 µL da fase superior desta mistura foi retirada e transferida para um *vial* contendo 2,5 mL de líquido de cintilação que foi finalmente levado ao contador beta por 5 min.

3.5.5 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com Isoproterenol (ISO)

Adipócitos isolados foram incubados em tampão Earle/Hepes contendo 20 mM/BSA 1 % de glicose (5 mM), pH 7,4 na presença ou ausência de isoproterenol 1 µM (agente lipolítico). As células foram previamente tratadas por 30 min com adenosina (0.2 µM). Em seguida, acrescentou-se adenosina desaminase (ADA, Sigma, 0,2 U/mL em tampão EHB, pH 7,45) e incubou-se por mais 30 min. (para possibilitar a degradação da adenosina liberada pelos adipócitos, pois esta tem ação anti-lipolítica e pode mascarar os resultados). Em seguida, foi adicionado isoproterenol (10^{-6} M) e o tempo de incubação foi de 60 min a 37 °C e, ao final, a mistura de incubação (volume total= 200 µl) foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 4 °C por 5 min a 7000 rpm.. Alíquotas (120 µL) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células pelo método enzimático-colorimétrico, utilizou-se Kit de Determinação de Glicerol Livre (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Procurando diminuir ainda mais qualquer influência nos resultados, foi feito uma incubação, a qual seguiu todos os procedimentos, exceto a adição de isoproterenol e a subsequente incubação da mistura por 60 min. O valor obtido nesta determinação (considerado como liberação não específica de glicerol) foi descontado das demais (basal e estimulada por isoproterenol).

3.5.6 Determinação da atividade de enzimas lipogênicas

Brevemente, as amostras de TA foram submetidas à extração em tampão específico para cada enzima, homogeneizadas por 30 segundos em Polytron (20000 rpm) e centrifugadas a 4 ºC. No homogenato livre de gordura (fat cake free), as atividades foram determinadas a 340 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 6,22, durante tempo e temperatura específicos para cada enzima. A atividade máxima enzimática foi obtida através da inclinação da curva de absorbância x tempo. As proteínas foram quantificadas pelo kit de ensaio

protéico BCA™ (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína presente no extrato.

3.5.6.1 Atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi determinada segundo metodologia aplicada conforme Bergmeyer, et al. (1974), Newsholme, et al. (1978). Utilizando tampão de extração (1:1) contendo Tris-HCL (50mM), EDTA (1mM, pH=8,0) durante 10-20 segundos a 4 ºC. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos. O tampão de ensaio utilizado (volume 270 µl) consistiu de Tris-HCL (8,6 mM), $MgCl_2$ (6,9 mM), NADP (0,4 mM) e Triton X-100 (0,05% (v/v), pH 7,6). A reação foi iniciada com a adição de 15 µl de glicose-6-fosfato 1,2 mM ao extrato enzimático e acompanhada por 10 minutos (25 ºC).

3.5.6.2 Atividade da ácido graxo sintase (FAS)

A atividade da FAS foi determinada segundo metodologia aplicada conforme Letexier, et al., (2003)[35]. Utilizando tampão de extração (1:1) contendo sacarose (250 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), leupeptin (20 µg/mL), antipain (2 µg/mL) e pestatin (1 µg/mL) pH 7,4. Após a homogeneização e centrifugação, um volume de 15 µL do infranadante foi utilizado para análise da atividade máxima da enzima, como medida da oxidação (consumo) total de NADPH.

O tampão de ensaio utilizado (270 µL) consistiu de KH_2PO_4 (100 mM), acetilCoA (100 µM) e NADPH (200 µM), pH=6,5. A reação foi iniciada com a adição de 10 µL de malonilCoA (600 µM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 10 minutos (37 ºC).

3.5.6.3 Atividade da enzima málica (ME)

Para a determinação da atividade máxima da enzima ME foi utilizado a metodologia aplicada conforme Raymond Bazin and Pascal Ferré[62]. Utilizando tampão de extração (1:1) contendo Tris-HCL (20 mM), $MgCl_2$ (1 mM), KCL (100 mM), sacarose (250 mM) e β-mercaptoetanol (3mM), pH= 7,6. Após homogeneizado e centrifugado, 15 µL do infranadante foram a 250 µL do tampão de ensaio contendo, TRIS-HCL (50 mM), KCL (100 mM) e Triton X-100 (1%, v/v), NADP (0,2 mM) e 20 µL de $MnCl_2$ (20 mM). A reação foi iniciada com a adição de 10 µL de malato (40 mM, pH=7,4) ao extrato enzimático e acompanhado por 10 min (37 ºC).

3.5.7 Atividade da enzima citrato sintase (CS)

No tecido muscular, a citrato sintase catalisa a entrada de carbono no ciclo de Krebs, reação entre acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato e CoA. O oxaloacetato é regenerado após completada uma série do ciclo de Krebsa atividade da citrato sintase foi determinada no músculo *soléos*, segundo método descrito por ALP et al. (1976). Amostras do músculo sóleo foram homegeneizadas em 1mL de tampão de extração contendo Tris-HCL (50 mM), EDTA (1mM, pH=7,4) durante 10 segundos a 4 ºC e cetrifugados (6000 rpm, 15 segundos, 4º C) para a separação dos restos celulares. O tampão de ensaio (250µl) contendo Tris-aminometano (100mM), DTNB (0,2 mM), acetil-COA (0,1 mM) e Triton X-100 (0,05% (v/v), pH=8,1). A reação foi iniciada com a adição de 10 µl de oxaloacetato (10 nM) ao extrato enzimático e acompanhada por 10 minutos (25 ºC). A absorbância foi monitorada a 412 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda 13,6. A atividade máxima enzimática foi obtida através da inclinação da curva de absorbância x tempo. As proteínas foram quantificadas pelo kit de ensaio protéico BCA^{TM} (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína presente no extrato.

3.5.8 Determinação da composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada a partir da análise química da carcaça, a qual avaliou o percentual de massa magra e lipídios presente na carcaça.

A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, incluído a cabeça, com exceção da amostra de sangue (aprox. 9 mL), do fígado , coração, dos músculos sóleos e dos coxins adiposos SC, PE e RP que foram removidos.

3.5.8.1 Lipídios

Toda a carcaça seca foi então picada, embrulhada em gaze e envolvida por papel filtro (Whatman). Por meio da técnica de extração, com éter etílico (Synth) como solvente, foi removido todo o lipídio da carcaça, utilizando-se o aparelho de Soxhlet.

Depois de 2 dias, o solvente foi eliminado por evaporação e o balão pesado. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e do balão com

lipídios forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal foi calculado dividindo-se a quantidade de gordura na carcaça pelo peso corporal final, conforme a fórmula:

% gordura corporal = gordura absoluta (g) / peso corporal final(g)

3.5.8.1 Massa magra

O valor absoluto de massa magra foi calculado a partir da divisão entre o peso corporal final e o valor absoluto de lipídio. O percentual de massa magra é a divisão entre seu valor absoluto pelo peso corporal final, conforme fórmula:

Massa magra = peso corporal final – gordura total

% massa magra = massa magra / peso corporal final

3.6 Dosagens bioquímicas e hormonais

3.6.1 Determinação de Glicose, Insulina, $HOMA_{IR}$ Triacilglicerol (TAG) e Colesterol Total

A concentração sérica de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase. O ensaio foi realizado utilizando o kit Glicose Enzimático (CAT Nº 02200, LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil).

O TAG foi determinado por método enzimático. Para este ensaio foi utilizado o kit Triglicerídeos (CAT Nº 02700, LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil).

O Colesterol Total foi determinado pelo método enzimático. Para este ensaio foi utilizado o kit Colesterol (CAT Nº 01400, LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil).

Para avaliação da insulinemia foi utilizada a técnica de radioimunoensaio. Para tanto, a solução reagente incluiu uma quantidade conhecida de anticorpo, uma

quantidade conhecida do hormônio marcado radioativamente (insulina marcada com iodo – 125I, Amershan Biosciences, Inglaterra) e uma quantidade desconhecida de hormônio não radioativo (amostra). Como as duas formas do hormônio, radioativos e não-radioativos, competem por um mesmo número de locais de ligação no anticorpo, quanto mais hormônio não radioativo estiver presente, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo insulina-anticorpo marcado formado é precipitado com polietilnoglicol (PM 6000) e dosado em contador tipo gama (PerkinElmer, Turku, Finlândia).

Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo é plotada como função da concentração do hormônio não-radioativo estiver presente. A seguir, a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra.

O índice $HOMA_{IR}$ foi calculado a partir dos resultados obtidos das dosagens de glicose e insulina plasmática ({[GLU] (mM) x [INS] (ng/mL)}/22.5) (LEVY; MATTHEWS; HERMANS, 1998).

3.7 Análise Estatística

Para análise da evolução de peso e ensaios biológicos com estímulos (insulina e isoproterenol) foi utilizado ANOVA *Two Way* para medidas repetidas. Nos demais, o teste ANOVA *one Way* foi utilizado para avaliar a existência de diferenças. O teste Tukey foi empregado como pós-teste, com o intuito de comparar diferenças entre os grupos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), o grau de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram feitas a partir do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

4.1 Peso e composição corporal

Não houve diferenças estaticamente significativas entre os ganhos de peso dos grupos - controle sedentário e treinado – durante as 8 semanas de treinamento (Figura 2). Entretanto, observou-se, após duas semanas de encerramento do TF (15ª semana de vida), que os grupos S e D apresentaram tendência a ganhar mais peso do que os animais T (FIGURA 2). Embora não tenha sido observadas diferenças entre os pesos finais, o ganho de peso do grupo D, durante as 8 últimas semanas (período de destreinamento), foi significativamente maior que o grupo T (tabela 1).

Quanto à composição corporal da carcaça dos animais (figura 3), observamos que o grupo T apresentou redução significativa do conteúdo de lipídios e, por conseguinte, aumento de massa magra em relação aos demais grupos.

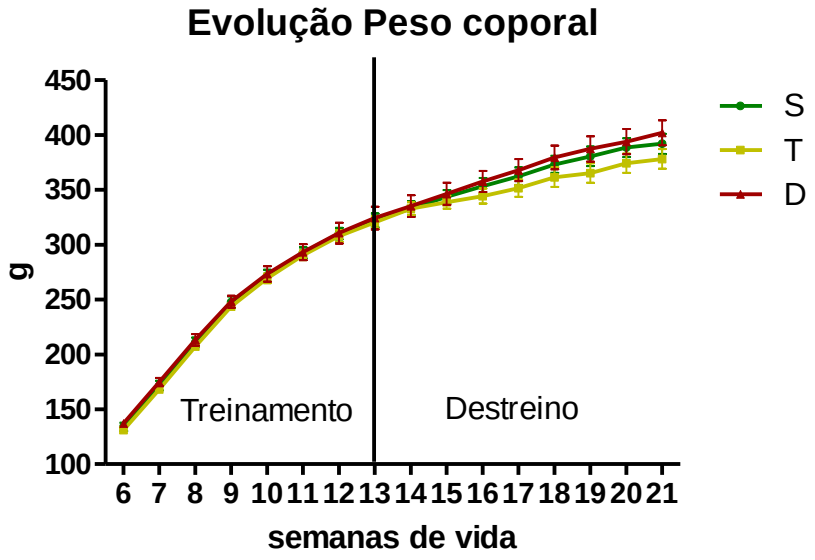

Figura 2 - Evolução do Peso Corporal. Peso corporal dos animais (g) ao longo do seu desenvolvimento. Medidas realizadas uma vez/semana. Valores em gramas correspondem à média ± EPM do grupo representativo de cada semana do desenvolvimento do animal (n=30).

Tabela 1 - **Peso inicial-final e ganho de peso no destreinamento**

	S	T	D
Peso $_{(I)}$	134±9,29	131±8,84	137±9,89
Peso $_{(F)}$	382±8,48$^{\#}$	365±8,32$^{\#}$	391±11,6$^{\#}$
Ganho de Peso	69,64±4,54	57,80±5,19	77,60±3,00*

Peso corporal inicial ($_{I}$), final ($_{F}$) e média do ganho de peso entre a 13ª e 21ª semanas dos animais (g). Valores em gramas (g) correspondem à média ± EPM (n=10/grupo). (*) D vs. T (p<0,05); ($^{\#}$) em relação ao peso inicial (p<0,001).

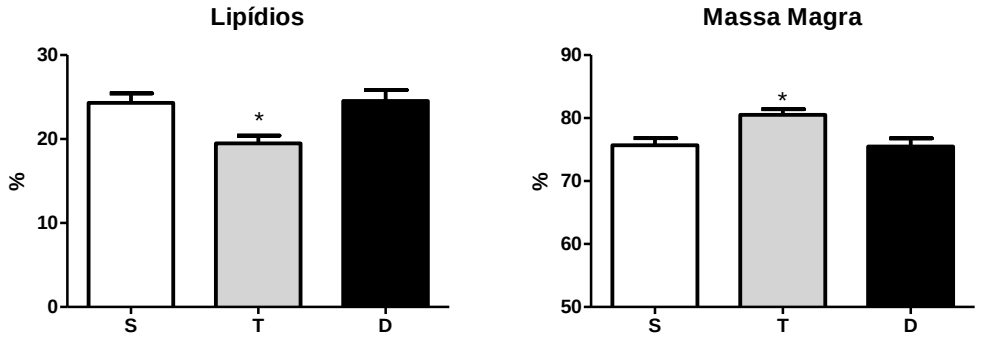

Figura 3. **Composição corporal relativa da carcaça.** Percentual de gordura e massa magra da carcaça dos animais (%). Valores correspondem à média ± EPM (n=10/grupo). (*)=T vs. demais grupos (S e D) (p<0,05).

4.2 Consumo alimentar e ingestão de água

A figura 4 apresenta a média de consumo diário de ração dos grupos experimentais, durante o estudo. Pode-se observar que o consumo de ração foi semelhante entre os grupos, não diferindo estatisticamente.

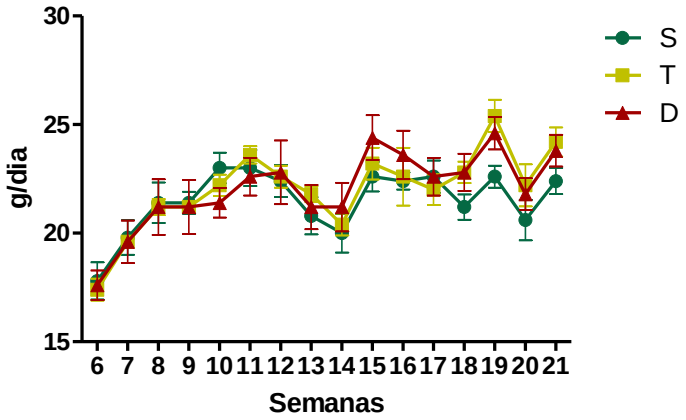

Figura 4. Consumo de Ração. Consumo de ração medido semanalmente (g). Valores em gramas correspondem à média ± EPM do grupo (n=15). Não foram encontras diferenças estatísticas.

Pela figura 5 verifica-se que não houve diferença significativa em relação ao consumo diário hídrico entre os grupos S, T e D.

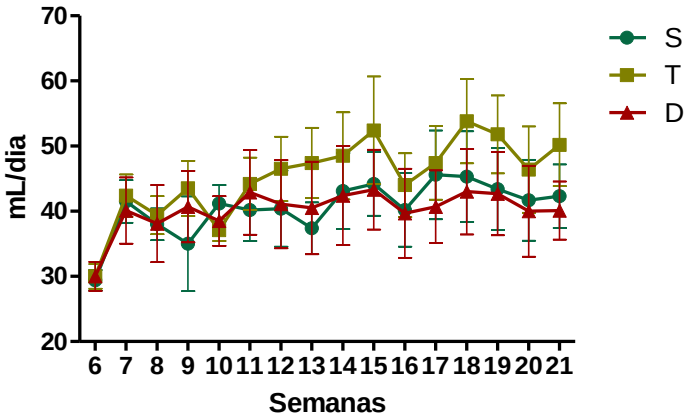

Figura 5. Ingestão hHídrica. Consumo de hídrico medido semanalmente (ml). Valores em ml correspondem à média ± EPM do grupo (n=15). Não foram encontras diferenças estatísticas.

4.3 Dosagens bioquímicas

Na tabela 2, podemos observar que os grupos T e D não apresentaram diferenças em relação ao grupo S nas concentrações séricas de glicose e TAG em jejum. Em relação ao colesterol total plasmático, o grupo T apresentou redução significativa em relação aos demais grupos (S e D).

Tabela 2 - Dosagens bioquímicas plasmáticas

	S	T	D
Glicose (mg/dL)	131,9 ± 4,89	127,2 ± 5,08	141,2 ± 6,21
Triglicérides (mg/dL)	38,81 ± 5,14	32,02 ± 2,63	35,22 ± 2,57
Colesterol T. (mg/dL)	53,18 ± 1,97	45,22 ± 1,20**	51,65 ± 1,85

Média ± EPM dos grupos (n=8-10/grupo). Valores expressos em (mg/dL) (**)= T vs. demais grupos (S e D) (p< 0,05).

4.4 Dosagens hormonais

Verificamos que o destreinamento aumentou significativamente a concentração de insulina no soro em relação aos demais grupos (S e T) (FIGURA 6). Além disso, observamos que o grupo D apresentou maior índice $HOMA_{IR}$, configurando uma condição de resistência à insulina (FIGURA 6).

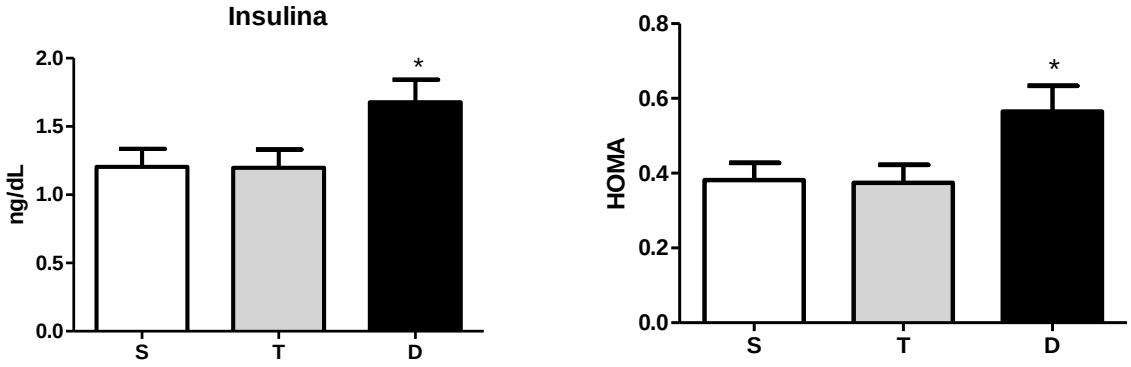

Figura 6 – Dosagem plasmática de insulina e avaliação da resistência à insulina mediante o Índice $HOMA_{IR}$ (*homeostasis model assessment)*. Média ± EPM dos grupos (n=7-9/grupo). Valores expressos em ($nM.ng.mL^{-1}$) (*)= vs. demais grupos (S e T) (p< 0,05).

4.5 Coxins adiposos

Após o sacrifício, os coxins SC, PE e RP foram retirados e pesados. O TF resultou em menor massa adiposa em relação ao grupo S e D, indicando que o treinamento, quando interrompido por 8 semanas, possibilitou a reversão da massa adiposa igualando-a ao grupo S (FIGURA 7).

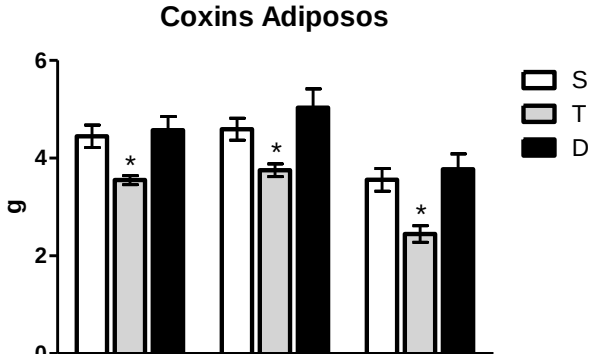

Figura 7 - Massa dos coxins adiposos. Os dados foram agrupados de maneira a demonstrar o peso dos coxins adiposos das regiões PE, SC e RP dos grupos S, T e D. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=31). Valores expressos em (g). (*)= T vs. demais (S e D) (p<0,05).

Os adipócitos isolados dos coxins SC, PE e RP dos animais treinados foram significativamente menores do que os dos sedentários e destreinados (FIGURA 8). Estes achados corroboram com os resultados apresentados anteriormente sobre os coxins adiposos (FIGURA 7), em que, com o encerramento do TF, os animais destreinados apresentaram hipertrofia dos adipócitos. Como pode ser observado na figura 9, os grupos S, T e D não apresentaram diferença significativa na celularidade.

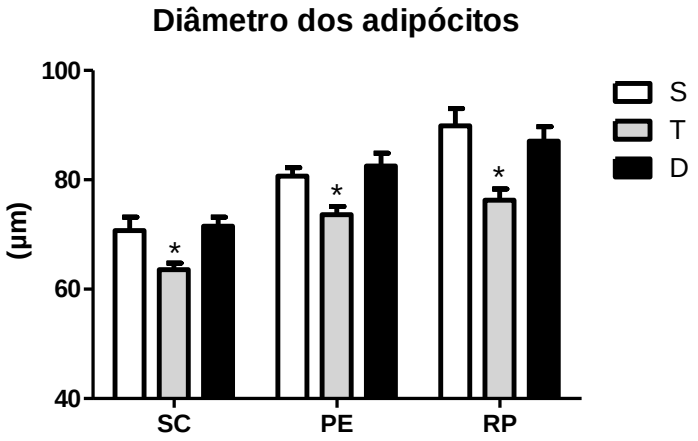

Figura 8 - Diâmetro Médio Adipócitos. Foram determinados os diâmetros médios de adipócitos isolados das regiões subcutânea (SC) periepididimal (PE) e retroperitonial (RP). As barras representam média ± EPM (n=10/grupo (PE) n=5/grupo (SC e RP)). Valores expressos em (µm). (*)= T vs. demais (S e D) (p<0,05).

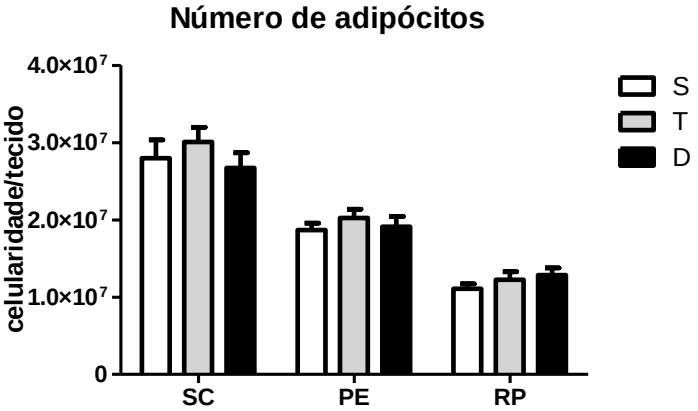

Figura 9 - Número médio de adipócitos. Foram determinadas a quantidade estimada de células adiposas nas regiões subcutânea (SC) periepididimal (PE) e retroperitonial (RP). As barras representam média ± EPM (n=10/grupo (PE) n=5/grupo (SC e RP)). Valores expressos em (nº de células x10^7). Não foram encontradas diferenças estatísticas.

A figura 10 traz imagens de adipócitos captadas por meio de uma câmera acoplada ao microscópio óptico. Por meio delas é possível constatar uma diferença, até mesmo visual entre adipócitos do grupo treinado (B) com adipócitos dos grupos sedentário (A) e destreinado (C) .

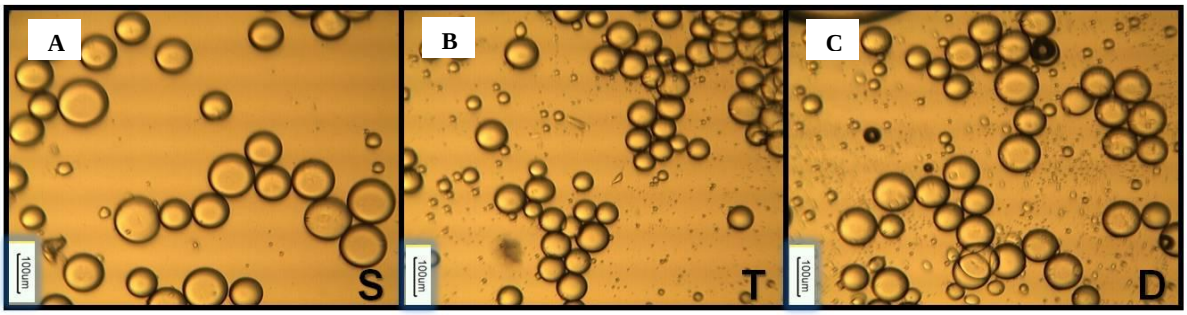

Figura 10 - Imagens de adipócitos da região periepididimal (PE) captadas em M.O. (A) Adipócitos de tecido PE de um animal sedentário (B) Adipócitos tecido PE de um animal treinado. (C) Adipócitos de tecido PE de um animal destreinado.

4.6 Avaliação do treinamento

A atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo *soleus* foi utilizada para avaliar a efetividade do TF. Na figura 11, observa-se que o grupo T apresentou maior atividade desta enzima do que S ($p<0.05$). No caso do grupo D, não houve diferenças em relação ao grupo S, mas, ao mesmo tempo, os valores não diferiram do grupo T.

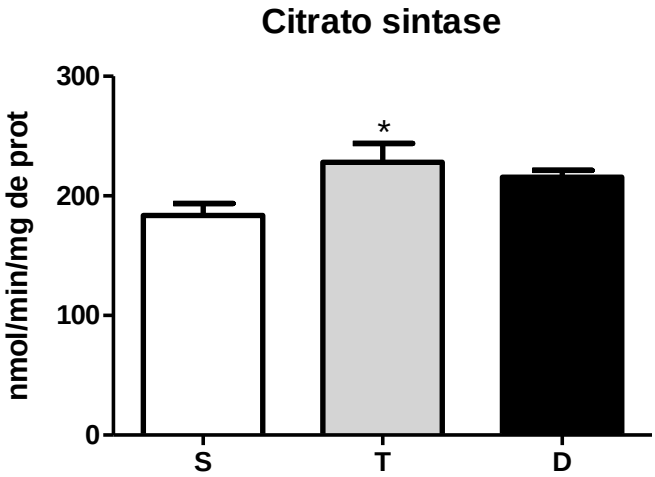

Figura 11 - Atividade da Enzima Citrato Sintase. As barras representam à média ± EPM dos grupos (n=5/grupo). Valores expressos em (nmol/min/mg_{prot}) (*)= T vs. S ($p< 0,05$).

4.7 Ensaios Biológicos

4.7.1 Avaliação da capacidade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol

Na avaliação da capacidade lipolítica de adipócitos isolados do coxim PE, tanto o treinamento quanto a sua interrupção por 8 semanas não promoveram diferenças estatísticas entre os grupos, seja na resposta lipolítica "espontânea" (obtida na ausência do agente beta-adrenérgico) ou em presença de isoproterenol 10^{-6} M (FIGURA 12). Além disso, a diferença (Δ) entre o glicerol liberado na presença de isoproterenol e a situação basal foi similar entre os grupos.

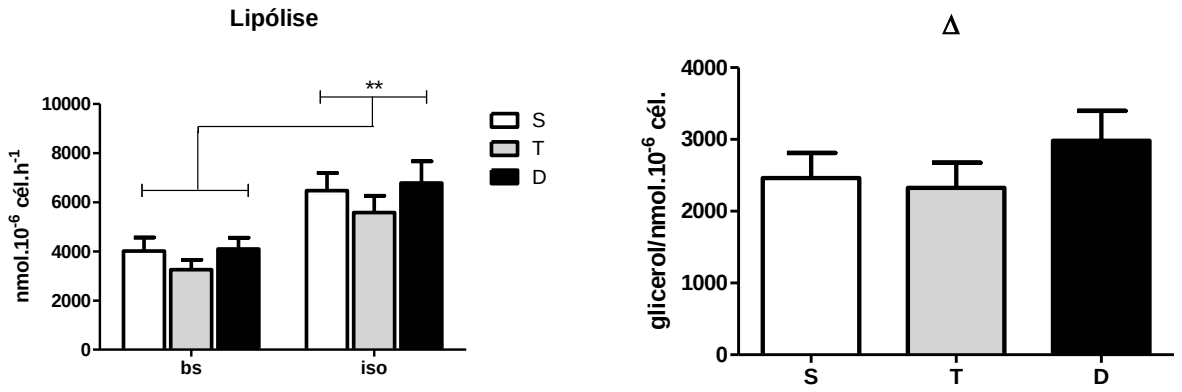

Figura 12. Capacidade Lipolítica em Tecido Adiposo Periepididimal. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por Isoproterenol (n=8-10/grupo). Δ = iso-bs. Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). (**)= basal vs. Isoproterenol (p<0,05).

4.7.2 Captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([^{3}H]-2DG)

A [^{3}H]-2DG é captada pelos transportadores de glicose, mas não é metabolizada. Neste sentido, podemos avaliar qual a capacidade em transportar glicose para dentro do adipócito numa condição basal (espontânea) e estimulada com insulina.

No que concerne os resultados de captação de 2-DG na condição basal, os grupos não apresentaram diferença significativa, tanto quando avaliado por unidade de área de superfície celular, como por 10^6 de adipócitos. Por outro lado, quando estimulados com insulina, os adipócitos do grupo D apresentaram resposta reduzida à ação deste hormônio quando comparado ao grupo S (FIGURA 13).

Como pode ser observada na figura 14, verificamos que os grupos T e D respondem menos ao estímulo de insulina na captação de 2-DG (expresso por 10^6 células).

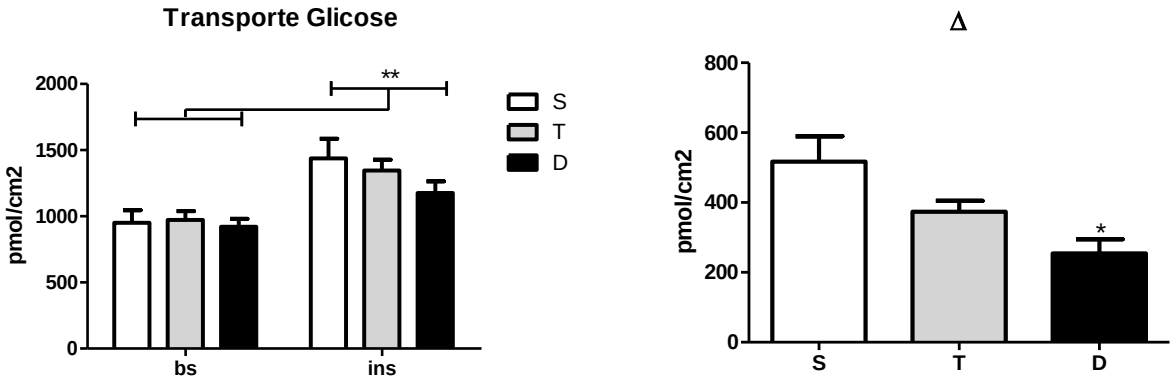

Figura 13. Captação de Glicose por área em Tecido Adiposo periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por insulina (n=5/grupo). Δ = ins-bs. Valores expressos em (pmol/cm^2). (*) vs. S (p<0,05); (**) basal vs. insulina (p<0,05).

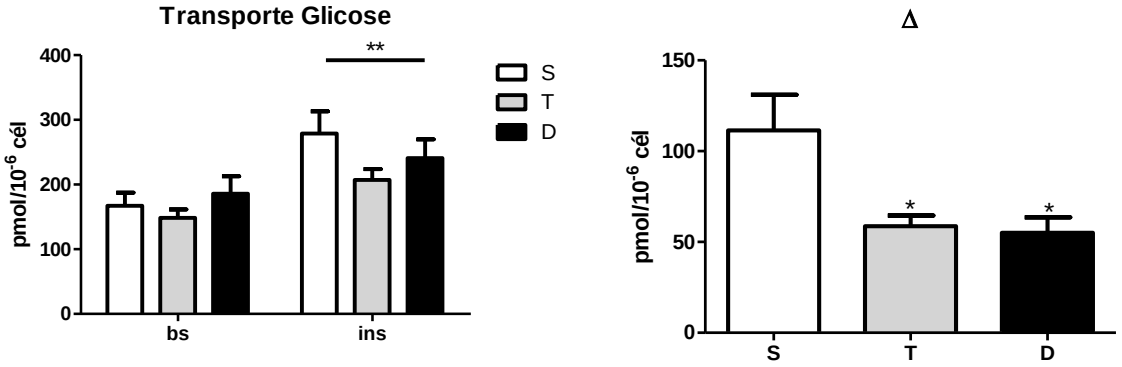

Figura 14. Captação de Glicose por número de células em Tecido Adiposo periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por insulina (n=5/grupo). Δ = ins-bs. Valores expressos em (pmol/$10^{-6\ cél}$). (*) vs. S (p<0,05); (**) basal vs. insulina (p<0,05).

4.7.3 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$

Neste ensaio, verificamos que o grupo D apresentou maior capacidade de oxidar glicose e foram mais responsivos à insulina que ratos do grupo S. As taxas basais de oxidação da glicose foram similares nos três grupos, com tendência (p<0,06) das células do grupo D oxidar mais glicose que S (FIGURA 15).

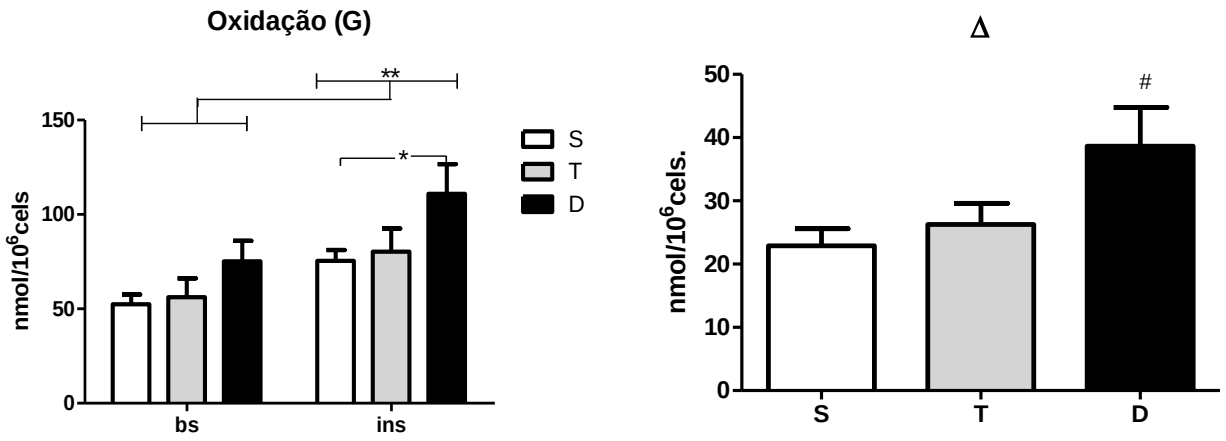

Figura 15. Oxidação de Glicose em Tecido Adiposo periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=8-10/grupo). Δ = ins-bs. Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). (*****)= D (ins) vs. S (ins) ($p<0,05$); (**)= basal vs. insulina ($p<0,01$); (#) D vs. S ($p<0,05$).

4.7.4 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Lactato em lipídeos

A glicose é um importante substrato que pode ser utilizado para a síntese local de AG, assim como, pode ser incorporada no resíduo glicerol de lipídios. Podemos observar na figura 16 que o adipócito do grupo T apresenta menor capacidade de incorporar glicose em lipídios, principalmente, após o estimulo com insulina.

Quanto à utilização de lactato como substrato, observamos que à capacidade de incorporar este composto em lipídios não diferiu entre os grupos (FIGURA 17). Contudo, neste ensaio não avaliamos possíveis estímulos.

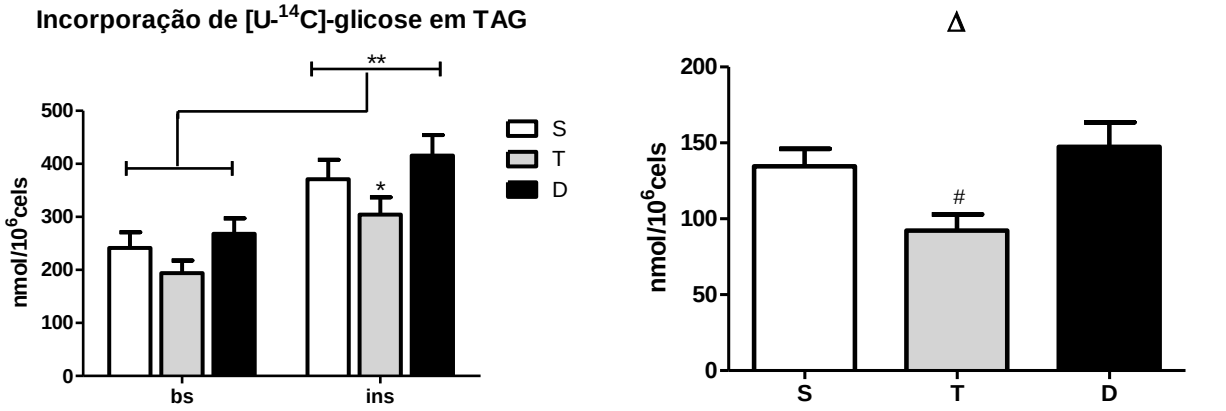

Figura 16. Lipogênese a partir de glicose em Tecido Adiposo periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e na estimulada por insulina, (n=8-10/grupo).). Δ = ins-bs. Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). (*)= T (ins) vs. D (ins) ($p<0,05$); (**) basal vs. insulina ($p<0,05$); (#) T vs. demais grupos (S e D).

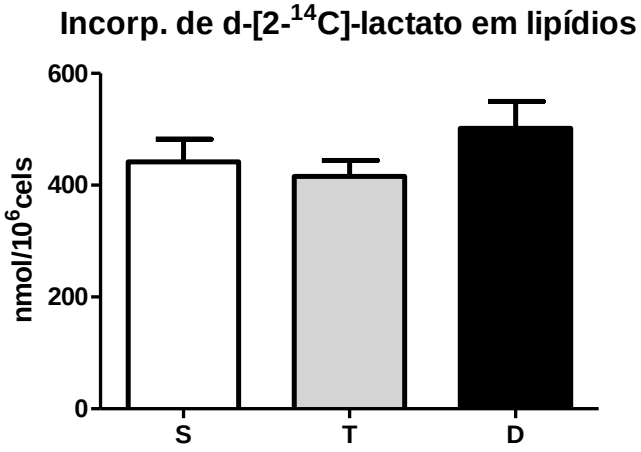

Figura 17. Lipogênese a partir do Lactato em Tecido Adiposo Periepididimal. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal (n=8-10/grupo). Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.7.5 Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Ácidos Graxos de Triacilgliceróis

Analisando a incorporação de glicose no resíduo AG de TAG em células adiposas, podemos avaliar a síntese *de novo*. Neste sentido, podemos observar na figura 18 que adipócitos do grupo T tem menor capacidade basal de incorporar glicose em AG do que o grupo D. Contudo, apesar dos grupos apresentarem estímulos máximos, o ganho pós-insulina (Δ) não foi diferente entre os grupos.

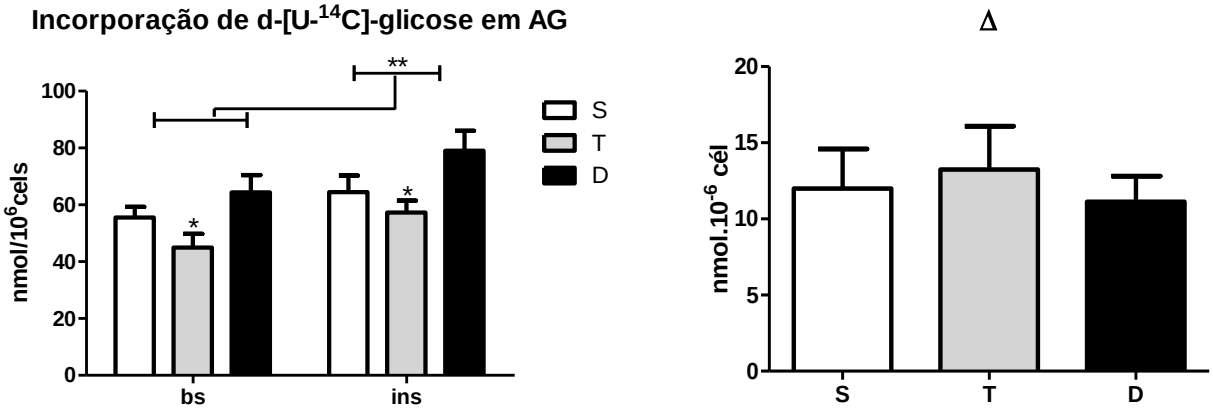

Figura 18. Incorporação de Glicose em AG de Triacilgliceróis em Tecido Adiposo Periepididimal. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por insulina (n=8-10/grupo). Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). (*) T vs. D (em ambos, basal e com insulina) ($p<0,05$).); (**) basal vs. insulina ($p<0,05$).

4.7.6 Incorporação de D-[U-^{14}C]-glicose em glicerol de triacilgliceróis

Descontando-se da radioatividade incorporada em lipídeos totais dos adipócitos e os resultados obtidos com a incorporação de glicose em AG de TAG, obtém-se o montante da radioatividade da ^{14}C-glicose incorporada em glicerol de TAG.

Neste sentido, constatamos que a maior parte da glicose incorporada em TAG é via síntese de glicerol. Podemos observar na figura 19 que a capacidade da insulina em estimular a síntese de glicerol a partir da glicose (Δ), é significativamente menor no grupo T em relação aos demais.

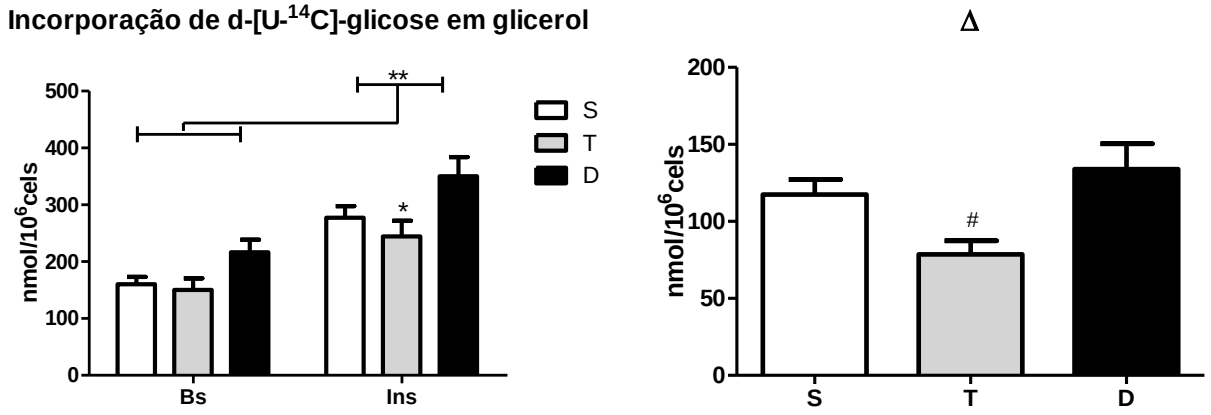

Figura 19. Incorporação de Glicose em Glicerol de Triacilgliceróis em Tecido Adiposo Periepididimal. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos na situação basal e estimulada por insulina (n=28).). Δ = ins-bs. Valores expressos em (nmol.10^{-6} células.h^{-1}). (*) T (ins) vs. D (ins) (p<0,05); (**) basal vs. insulina (p<0,05); (#) T vs. demais (S e D) (p<0,05).

4.8 Avaliação da atividade máxima de enzimas lipogênicas

A lipogênese *de novo* é uma via de síntese de AG a partir de substratos glicídicos no TAB. As enzimas, ácido graxo *sintase* (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e enzima málica (ME) são importantes para a síntese local de AG.

Os resultados a seguir, nos revelam que o modelo experimental (treinamento e destreino) não alterou a atividade máxima das enzimas FAS (FIGURA 20), G6PDH (FIGURA 21), EM (FIGURA 22) e ATP-CL (FIGURA 23).

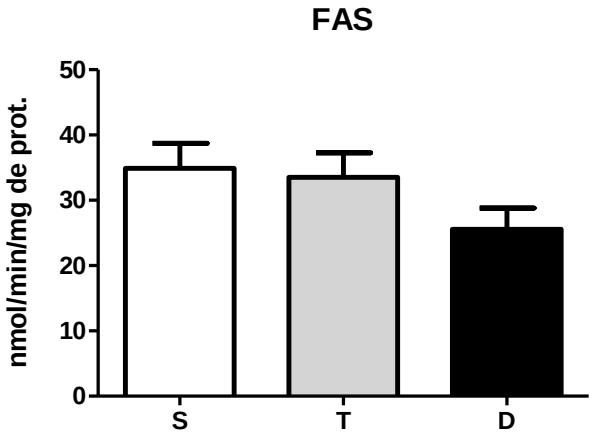

Figura 20. Atividade máxima da enzima ácido graxo sintase (FAS) no tecido periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=6-10/grupo). Valores expressos em (nmol/min/mg de proteína). Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

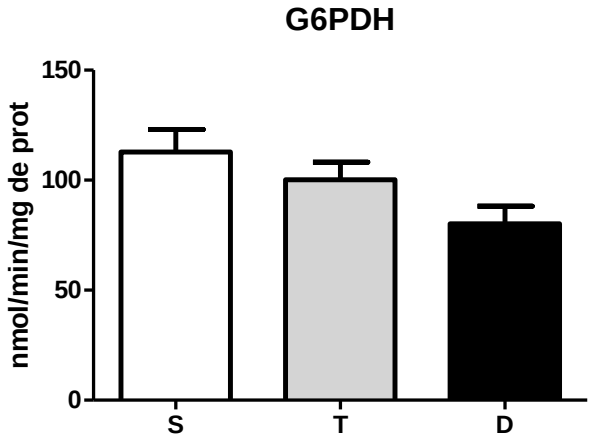

Figura 21. Atividade máxima da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no tecido PE. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=6-10/grupo). Valores expressos em (nmol/min/mg de proteína). Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

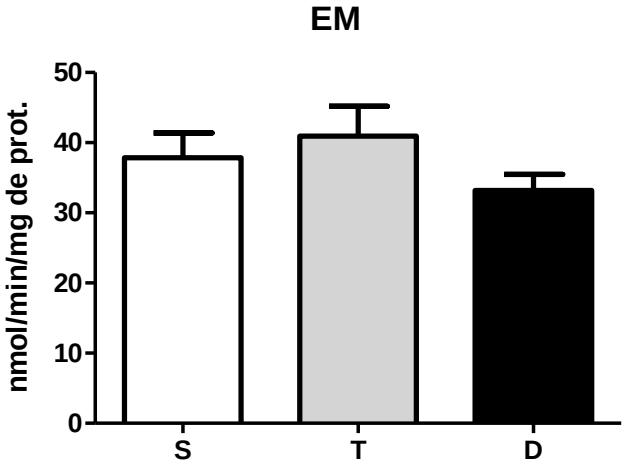

Figura 22. Atividade máxima da enzima málica no tecido PE. Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=6-10/grupo). Valores expressos em (nmol/min/mg de proteína). Não foram encontradas diferenças estatísticas.

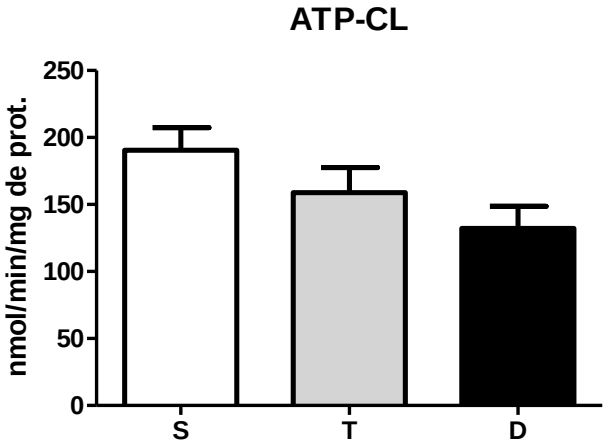

Figura 23. Atividade máxima da enzima ATP citrato liase na região periepididimal (PE). Cada valor corresponde à média ± EPM dos grupos (n=6-10/grupo). Valores expressos em (nmol/min/mg de proteína). Não foram encontradas diferenças estatísticas.

5 DISCUSSÃO

A principal função do TAB é atender as necessidades energéticas dos tecidos periféricos através da mobilização dos AG armazenados na forma de TAG. A sua autonomia funcional depende da manutenção de estoque adequado de TAG que é determinado pelo balanço entre dois processos antagônicos: a lipólise e a lipogênese.

A utilização do TF como modelo experimental que promove alterações quantitativas no armazenamento de TAG é conhecida por diversos trabalhos na literatura (BORGES-SILVA et al., 2005; PERES et al., 2005; DA LUZ et al., 2011; MIYAZAKI et al., 2010; NOMURA et al., 2002; LEHNEN et al., 2010). O período seguinte ao cessar da prática do treinamento ocasiona um rápido ganho massa adiposa, igualando-se em um curto período de tempo a indivíduos ou animais sedentários. Em um trabalho recente de nosso laboratório, verificou-se que a ingestão calórica pode contribuir para o rápido ganho de massa adiposa no tecido adiposo PE, os adipócitos, por sua vez, sofreram total reversibilidade na capacidade de sintetizar lipídios (SERTIÉ, 2010).

Além da quantidade de TAG mantida no TAB, resultado entre o balanço de síntese (lipogênese) e degradação (lipólise), outro fator que determina a sua massa é a diferenciação e a proliferação dos adipócitos. Dados recentes de nosso laboratório apontaram que o TF aumenta a expressão de fatores de transcrição relacionados à adipogênese na região estromal do tecido adiposo PE, por outro lado, apenas em animais destreinados foi constatado aumento no número de adipócitos recém-diferenciados. Neste sentido, ao analisarmos um período maior de destreinamento, iremos compreender melhor o funcionamento do TAB e suas repercussões para a homeostase energética.

Primeiramente, o protocolo de treinamento foi eficiente em estabelecer a diferença de condicionamento entre o grupo T comparado aos animais que não o fizeram, e isso foi comprovado pela determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase (FIGURA 6). Como em outros trabalhos, a atividade desta enzima apresentou um aumento significativo em ratos treinados (LEE et al., 2001; BORGES-SILVA et al., 2005; BARBARA et al., 2001; WARDZALA et al., 1982). Em nosso

caso, este aumento foi em torno de 37% para o grupo T. Quando encerramos o treinamento com o grupo D, nossos resultados apontam uma pequena redução desta capacidade (por volta de 15%) que não é significativa. Em relação ao grupo S, por sua vez, a atividade desta enzima também não se difere, neste sentido, o grupo D manteve-se de forma intermediária entre os demais.

Em um estudo de Evangelista e Brum (1999), os autores revisaram trabalhos que avaliavam a reversibilidade de parâmetros fisiológicos modificados pelo TF, entre eles, a atividade de enzimas oxidativas musculares, inclusive a citrato sintase em humanos. Nesse aspecto, observou-se que, na maioria dos casos, apesar do declínio da atividade das enzimas ao longo do destreinamento físico, independentemente do tempo de destreino, os valores finais ainda eram superiores aos valores pré-treinamento.

Apesar da inexistência de alterações no peso corporal, nossos resultados corroboram com alguns estudos da literatura em que os animais alimentados com dieta controle e que não eram induzidos e/ou apresentavam qualquer tipo de doença (hipertensão, diabetes e obesidade), não diferiam o peso corporal após o treinamento aeróbio (DA LUZ et al., 2011; PERES et al., 2005) ou até mesmo a sua interrupção (PAULI et al., 2007; LEHNEN et al., 2010; HEIDARIAPOUR et al., 2010; YASARI et al., 2007). Porém, observamos que esse parâmetro é controverso na literatura, sendo que estudos como os de Sakurai et al. (2010) e Miyazaki et al. (2010), o grupo T apresentou peso corporal significativamente menor em relação ao controle. Tais discrepâncias podem ser justificadas por diferenças nos protocolos de exercício, bem como a de idade, linhagem e sexo entre os animais.

Por outro lado, ao analisar o ganho de peso corporal de todos os grupos no período de destreinamento (13ª e 21ª semanas de vida), observamos que os animais D ganharam mais peso que os do grupo T (TABELA 1). Este aumento no ganho de peso no período de destreinamento, como dito anteriormente, não se refletiu no peso corporal final dos animais, mas, em relação ao peso dos coxins do TAB, observamos que o treinamento reduziu o acúmulo de gordura em todas as regiões avaliadas (SC, PE e RP) em relação aos demais grupos (S e D) (FIGURA 7). No entanto, observamos que o grupo D mesmo tendo realizado o TF prévio por 8 semanas, não foi suficiente para impedir o ganho de peso e adiposidade corporal.

Para melhor compreender os efeitos do TF sobre os constituintes corporais, decidimos analisar a composição corporal da carcaça dos animais, e conforme observamos na figura 3, o grupo T apresentou aumento no percentual de massa magra e diminuição no percentual do conteúdo lipídico em relação aos demais (S e D). Cabe lembrar que massa corporal magra é todo conteúdo corporal ausente de lipídios (ex.: pêlo, osso, músculo etc.). A maior massa magra encontrada no grupo T pode estar associada à prática do treinamento aeróbio desempenhada por esses animais. Uma vez que a realização de exercícios físicos, independente do tipo ou intensidade é um estimulo capaz de, pelo menos, mantê-la. Ao passo que nos animais D, à interrupção deste “estímulo” foi completamente revertido e estes animais voltaram a uma condição sedentária. Por outro lado, o sedentarismo, provavelmente, não desencadeou estímulos mínimos que favorecessem a manutenção ou o aumento da massa magra.

Vários trabalhos na literatura apontam um rápido aumento de gordura corporal, tanto em humanos (NOMURA et al., 2002; SIMSOLO et al., 1993), quanto em modelos animais (APPLEGATE; UPTON; STERN, 1984; ARNOLD; RICHARD, 1987; CRAIG; THOMPSON; HOLLOSKZI, 1991). Alguns desses estudos atribuem este incremento de peso ao desbalanço energético, uma vez que, quando treinados (e/ou destreinados), os sujeitos (ou animais) consomem mais calorias do que os controles (APPLEGATE; UPTON; STERN, 1984; ARNOLD; RICHARD, 1987). No estudo prévio de nosso laboratório, tal desbalanço favoreceu ao ganho de massa adiposa em 4 semanas de destreino, e este período foi suficiente em reverter o peso do coxim PE (SERTIÉ, 2010). Nesse sentido, nossos achados revelam que o acréscimo de mais 4 semanas não piora o quadro de adiposidade corporal em relação ao grupo sedentário.

No presente estudo não foram observadas diferenças no consumo alimentar e hídrico (FIGURAS: 4 e 5), o que nos indica que os animais comiam e bebiam igualmente, independentemente de praticar (grupo T), ter praticado (grupo D) ou não (grupo S) o TF. Em outras palavras, o protocolo utilizado não interferiu diretamente na saciedade e sede dos animais e que os resultados obtidos não foram consequência de um consumo diferenciado entre os grupos.

Em relação às dosagens plasmáticas, nosso modelo experimental não alterou as concentrações de glicose e TAG em jejum. Quanto ao colesterol total, verificamos que o TF foi eficiente em reduzir este parâmetro. O destreino, por sua vez, reverteu completamente os benefícios obtidos no treinamento (TABELA 2). A concentração plasmática em jejum de insulina, por outro lado, apresentou resultados que indicam uma compensação metabólica.

Partindo desse pressuposto, constatamos que o TF não alterou a sensibilidade e concentração plasmática de insulina, contudo, 8 semanas de destreino, resultou em maiores níveis deste hormônio em relação aos demais grupos (S e T) (FIGURA 6). Além disso, o grupo D apresentou uma condição de resistência à insulina, observados por aumento no índice $HOMA_{IR}$ (FIGURA 6).

Alguns trabalhos na literatura apontam em um curto período de cessação do TF (<4 semanas) o declínio significativo na sensibilidade à insulina (HOUMARD et al., 1993; MCCOY; PROIETTO; HARGREVES, 1994). Petibois et al. (2004) verificou que 6 semanas de interrupção do treinamento aumentava o índice de $HOMA_{IR}$ mas que, o prolongamento do destreino não piorava esse quadro em indivíduos saudáveis submetidos a um programa de exercícios. Resultados semelhantes também foram obtidos em outros estudos com humanos e animais treinados (BURSTEIN et al., 1985; NAGASAWA; SATO; ISHIKO, 1990). Rimbert et al (2009) verificou uma rápida perda na capacidade oxidativa muscular causadas por 4 semanas de destreino, por outro lado, este período não acarretou quaisquer alterações na sensibilidade à insulina de indivíduos treinados. De acordo com o autor, as perdas decorrentes de cessação do TF são proporcionais ao tempo e ao nível de condicionamento, e uma queda na sensibilidade à insulina é de se esperar após um longo período de destreino.

Em nossos achados o grupo T não teve uma redução na secreção deste hormônio, alguns fatores como a idade dos animais, o tipo e a intensidade do treinamento podem explicar, em parte, a magnitude das adaptações metabólicas induzidas pelo exercício. Contudo, fica evidente que há uma piora na sensibilidade dos tecidos insulinodependentes com o prolongamento do destreinamento e tal quadro precisa ser mais bem investigado.

Alguns estudos têm apontado que o TF aumenta o conteúdo de lipídios intramuscular, pelo aumento de *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator 1α* (PGC-α) que estimula a síntese *de novo* neste tecido (SUMMARMATTER et al., 2010*)*. Atletas de *endurance* apresentam aumento do conteúdo de gordura intramuscular. Essa gordura, por sua vez, é associada com a homeostase glicêmica e a sensibilidade à insulina no músculo (GOODPASTER et al., 2001; JACOB et al., 1999; PERSEGHIN et al., 1999; RUSSEL, 2004). Uma redução na capacidade oxidativa e, possíveis alterações no metabolismo da gordura intramuscular poderiam estar relacionadas em nosso modelo experimental. No entanto, não avaliamos possíveis repercussões do destreino no metabolismo muscular nem, tão pouco, no teor de gordura intramuscular, mas não podemos descartar tais hipóteses, além do que, os músculos são tecidos insulinodependentes e contribuem para o controle glicêmico.

Sabe-se que alterações na adiposidade também podem acarretar em complicações na homestase glicêmica, como resistência à insulina e hiperglicemia (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). O rápido ganho de massa adiposa está relacionado com o aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias que são produzidas e secretadas pelos adipócitos e induzem resistência à insulina. Dentre as elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), resistina e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), correlacionam-se negativamente com o metabolismo de lipídios e glicose (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; WARNE, 2003; WARNE, 2003; FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A inatividade física e o desbalanço energético levam ao acúmulo de gordura visceral que é acompanhado por infiltração de macrófagos e células T (agentes pró-inflamatórios) no TAB, o aumento na liberação destas adipocinas, desenvolve um estado de inflamação sistêmica de baixo grau (OUCHI et al., 2011). Isto pode promover o desenvolvimento de resistência à insulina, crescimento de tumores e aterosclerose. Em uma revisão recente, Gleeson et al. (2011) sugerem que os mecanismos antiinflamatórios decorrentes da prática regular de exercícios físicos são mediados, basicamente, pela redução da gordura visceral (co-relacionado ao aumento de adiponectina) e pela a indução de um ambiente antiinflamatório no organismo. Este ambiente discutido pelos autores, pode variar do aumento na liberação de cortisol e adrenalina

até o aumento de interleucina-6 (IL-6), um agente antinflamatório produzido e liberado pelo músculo, propiciado pela prática regular de exercícios.

Em nosso trabalho, em paralelo com o peso do coxim, observamos que o diâmetro médio das células adiposas isoladas de ratos do grupo T foi menor que os demais. O grupo D, por sua vez, recuperou o tamanho após o período de destreinamento (FIGURA 7). Apesar de termos avaliados somente a oitava semana de destreino, temos indícios de nosso laboratório que o grupo D recuperou a massa e o diâmetro das células adiposas em um período inferior de destreinamento físico (SERTIÉ, 2010). Nesse sentido, um rápido incremento do TAB e um possível aumento na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, seria uma hipótese plausível e não descartada por nós. Nessa perspectiva, não avaliamos em nosso trabalho, questões imunológicas do TAB e, não há na literatura, informações sobre o que o cessar abrupto do TF, poderia desencadear nesses parâmetros e no metabolismo do adipócito.

Em nosso desenho experimental, constatamos que o treinamento e a sua interrupção não alteraram a celularidade das regiões do TAB avaliadas (FIGURA 9). Nesse sentido, os resultados apontam que o TAB sofreu adaptações metabólicas do TF e que tal, não se deu por aumento ou diminuição no conteúdo de células. Estes resultados descartariam a hipótese levantada pelo nosso laboratório de que num tempo maior de destreinamento, haveria maior número de adipócitos na região PE e, consequentemente, maior adiposidade em relação ao grupo sedentário. Porém, cabe ressaltar, que a medida utilizada é uma inferência que se faz através da quantificação do volume celular e do peso do tecido avaliado.

5.1 Ensaios biológicos "*ex vivo*"

Para que haja essa redução e aumento da massa adiposa, alguns mecanismos intracelulares no adipócito precisam ser adaptados ou modificados. Em relação a tais mecanismos, podemos classificá-los em: hipertrofia celular, que, dito de maneira simples, seria o (des)balanço nos mecanismos de armazenamento (lipogênese) e mobilização energética (lipólise).

Outro fator importante é a hiperplasia de células adiposas, fenômeno também conhecido por adipogênese, e que é caracterizado pela conversão de pré-adipócitos

em adipócitos maduros. O presente estudo não investigou possíveis adaptações nesse parâmetro, contudo, cabe salientar que, tal mecanismo também é importante para a compreensão e funcionalidade do TAB.

Assim sendo, buscamos averiguar quais possíveis mudanças metabólicas (síntese e degradação de lipídios) decorrentes do TF aeróbio em um período maior de destreinamento no adipócito. Para tal, realizamos testes e ensaios biológicos com células adiposas *ex vivo*, com a finalidade de compreender melhor os fenômenos biológicos que controlam a expansão do adipócito no (des)treinamento físico.

5.1.1 Capacidade lipolítica de adipócitos isolados

A mobilização dos lipídios é uma das mais importantes funções metabólicas do tecido adiposo. A hidrólise (lipólise) de TAG e posterior liberação de AG e glicerol, consistem em fontes significativas de energia química para os músculos durante os períodos de maior demanda e é fundamental para a manutenção da homeostase energética, especialmente durante os exercícios aeróbicos de longa duração. Os níveis circulantes de catecolaminas é o principal estimulo hormonal da lipólise.

As catecolaminas circulantes (adrenalina e noradrenalina) agem em β-adrenoceptores e estimulam uma cascata de sinalização que acarretam em sucessíveis hidrólises da molécula de TAG, liberando AG e glicerol. Assim, podemos observar na figura 12, que tanto o treinamento quanto o destreinamento não influenciaram a resposta lipolítica da célula adiposa PE, contudo, o grupo T apresentou menores valores médios do que os demais (S e D), tanto na situação basal, quanto na estimulada com o agonista β adrenérgico. Dados não publicados de nosso laboratório revelam que animais treinados têm menor capacidade lipolítica do que sedentários e destreinados por 4 semanas (18 semanas de vida). Uma hipótese plausível é a de que tal fenômeno seria uma forma de auto-proteção do adipócito, em que, à medida que se atinge um estoque reduzido de TAG na gota lipídica a célula adiposa tende a reduzir sua capacidade lipolítica. Além do que, há estudos indicando que o TF não altera a lipólise basal e que até mesmo, a reduz em alguns depósitos de gordura, isso, tanto em ensaios in vitro (NOMURA et al., 2002), quanto in vivo (ENEVOLDSEN et al., 2000). Por outro lado, nossos achados contrapõem o conceito encontrado na literatura, que o treinamento aumentaria a

mobilização energética estimulada por agonistas adrenérgicos (BARBARA et al., 2001).

Nomura et al. (2002), observando que a atividade basal da HSL foi maior nos ratos treinados, mas a lipólise basal não, sugeriu a participação de um mecanismo duplo que envolve algum fator lipolítico na superfície das gorduras para a ativação da lipólise. Tal fator é denominado perilipina, uma fosfo-proteína predominante nos adipócitos e que forma uma camada “protetora” das gotículas lipídicas intracelulares, bloqueando o acesso das lípases a gota lipídica (CLIFFORD et al., 2000; TANSEY et al., 2001). Quando estimuladas (ex.: catecolaminas), as perilipinas são fosforiladas em vários sítios pela proteína quinase A (PKA) (CLIFFORD et al., 2000; TANSEY et al., 2001). Um alto nível de atividade das lipases nos adipócitos pode exigir a presença das perilipinas nas superfícies de gotículas lipídicas para proteger os depósitos de gordura da hidrólise de TAG. Assim, Nomura et al. (2002) sugeriu que as perilipinas estariam envolvidas na interação entre as gotículas de lipídios, as lipases e o perfil lipídico, desempenhando um papel importante na regulação da lipólise e do armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos. Além do mais, o TF também poderia alterar a quantidade e/ou função das perilipinas, regulando assim, a interação das lipases com seu substrato (NOMURA et al., 2002). Contudo, não avaliamos em nosso estudo se o TF e/ou sua cessação modulam a expressão ou afinidade desta fosfo-proteína a respostas lipolíticas.

5.1.2 Captação, oxidação e incorporação de glicose em lipídios

O estoque de TAG no TAB deve ser reconstruído entre as sessões de exercício e, a deposição de gordura é um aspecto importante do metabolismo energético. Os lipídios armazenados no TAB, na forma de TAG, têm origem a partir dos AG ingeridos, sob a forma de quilomicrons, ou reconstituídos em lipoproteínas (VLDL) de origem hepática, ou da síntese a partir da glicose, um processo denominado lipogênese *de novo* (LDN) (FRAYN, 1992; FRAYN, 1996).

A LDN é uma das vias de metabolização da glicose no adipócito, que começa com a sua entrada através de transportadores de glicose (GLUT). Na célula adiposa, a glicose é metabolizada e pode seguir para a: glicólise; via das pentoses; ou é armazenada como triacilglicerol. Através da glicólise, a glicose pode ser convertida em AG (via LDN), ou em glicerol-3-fostato. Pode ainda, ser metabolizada em lactato,

ou oxidada, a fim de fornecer ATP ao adipócito. A via das pentoses produz NADPH (a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato [NADP]), que é usado durante a LDN (LEHNINGER, 1982) (ver FIGURA 1). A lipogênese a partir da glicose pode ser regulada pelo estado nutricional, principalmente pela disponibilidade de carboidratos, e por fatores hormonais, como a insulina (FERRÉ, 2001).

Com relação ao o efeito do treinamento e sua interrupção sobre o metabolismo de glicose no adipócito, primeiramente investigamos o transporte de 2-DG. Tal substrato é transportado para dentro da célula através dos mesmos transportadores de glicose e, após ser fosforilado (2-desoxiglicose-6-fosfato) não é metabolizado pelo adipócito. Com isso, buscamos averiguar se o treinamento e a sua cessação poderiam afetá-lo, uma vez que um aumento e/ou redução desse processo poderia complementar o metabolismo de glicose no TAB.

A capacidade espontânea de transportar glicose não foi alterada com o TF e sua interrupção (FIGURA 13). Quando estimulados com insulina, a diferença (denominado neste trabalho de delta - Δ) entre a situação basal e estimulada foi significativamente menor nos adipócitos do grupo D em relação ao grupo S. Tal resultado foi expresso tanto em área de tecido (pmol/cm^2) (FIGURA 13), quanto por 10^6 de células (pmol/10^6 céllulas) (FIGURA 14). Neste último, constatamos também uma redução do grupo T em relação ao grupo S. Cabe salientar, que ao avaliarmos o transporte por 10^6 de adipócitos, não levamos em conta a área de superfície de membrana. Assim, como a média do diâmetro dos adipócitos é significativamente menor no grupo T, logo, é compreensível que este apresente menor captação do que os demais. Entretanto, as células dos animais destreinados não possuem menor diâmetro e com isso, o delta (Δ) de transporte reduzido neste grupo, se deve por algum mecanismo que varia entre a própria insulina, sua via de sinalização e ação ou número de transportadores de glicose.

Alguns estudos apontam que em um curto período de destreino, há uma completa reversibilidade do conteúdo de GLUT-4 tanto em músculo, quanto no TAB, ou seja, em algumas semanas o conteúdo e a atividade dos transportadores retornam a níveis pré-treino ou sedentários (REYNOLDS et al., 2000; LEHNEN et al., 2010). Não há na literatura nenhuma informação quanto a um longo período de

destreino e redução de transportadores no TAB. Em nosso estudo não avaliamos a expressão dessa proteína, contudo uma possível deficiência no seu processo de síntese e ou translocação explicaria uma deficiência no transporte.

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório, foi demonstrado que a prática de TF por 7 semanas, apesar de não reduzir a massa do coxim PE, foi eficiente em diminuir o volume celular dos adipócitos. Isso melhorou a responsividade à insulina pela melhora na comunicação na via de sinalização IRS/PI3-K/Akt. Conseqüentemente, houve melhora na captação de glicose em adipócitos provenientes do coxim PE de animais treinados (PERES et al., 2005). Nossos resultados não corroboram com tal melhora no adipócito, porém, cabe salientar que os animais utilizados no estudo citado eram mais jovens (13 *vs.* 22 semanas de vida). De forma igual ao presente estudo, trabalhos mais recentes de nosso laboratório não apresentaram diferenças no transporte de 2-DG em animais treinados (18 semanas de vida), nem tão pouco, nos destreinados (SERTIÉ, 2010). Tais discordâncias colaboram com uma possível hipótese: o fator envelhecimento pode repercutir na resposta da célula adiposa e nos resultados de nosso laboratório.

De acordo com os resultados obtidos no transporte, nossos achados reforçam a idéia de que os animais destreinados por período maior apresentam uma resistência à insulina e que, em parte, tal quadro se deve a uma menor capacidade de captação de glicose estimulada por insulina nos adipócitos (região PE). Essa redução na diferença (Δ) de captação pode estar relaciona em muitos níveis, como: diminuição na concentração de IR e sua atividade quinase, na concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, da atividade da PI3-K, na síntese e ou translocação do GLUT-4, atividade de enzimas intracelulares, entre outros (PESSIN; SALTIEL, 2000; SALTIEL; KAHN, 2001). Neste trabalho não podemos afirmar com precisão qual destes mecanismos foi modificado pelo destreino. No entanto, avaliando os demais ensaios biológicos, acreditamos que a sinalização intracelular pós-insulina, não está, em termos, totalmente prejudicada.

Sobre a metabolização celular, realizamos um ensaio de oxidação de glicose até CO2. Este, por sua vez, nos fornece informações sobre uma via responsável pela produção de energia a partir desse substrato. Só foram encontradas diferenças em relação à oxidação de glicose estimulada por insulina entre os grupos D vs. S

(FIGURA 15). Isto sugere que o período de destreinamento aumenta a capacidade da célula em oxidar glicose e isto é evidenciado principalmente na presença de insulina. Entretanto, mesmo sem este estimulo (insulina), há uma tendência ($p<0,06$) desta mesma resposta celular. Por outro lado, animais sedentários e treinados não apresentaram diferenças entre si neste processo metabólico.

Alguns estudos examinaram o efeito do treinamento sobre o metabolismo de glicose em adipócitos, especialmente em células *in vitro* de ratos (STALLKNECHT, 2001). Quando não estimulados com insulina (estado basal), relatou-se um aumento na oxidação deste substrato em alguns trabalhos (CRAIG; FOLEY, 1984; WARDZALA et al., 1982; CRAIG THOMPSON; HOLLOSZY, 1983), em outros, no entanto, não se verificaram mudanças (CRAIG et al., 1981; PALMER; TIPTON, 1974; CRAIG; TREADWAY, 1986) e um estudo, apresentou diminuição da resposta nos treinados em comparação com os sedentários (LAWRENCE et al., 1989). Segundo Stallknecht (2001), isso indica que o TF provavelmente não tem grande influência sobre o metabolismo basal de glicose em adipócitos.

Por outro lado, quando os adipócitos foram estimulados com insulina, muitos estudos apontam que animais treinados apresentaram aumento na oxidação de glicose em relação aos sedentários (CRAIG; FOLEY, 1984; WARDZALA et al., 1982; CRAIG THOMPSON; HOLLOSZY, 1983; CRAIG et al., 1981; PALMER; CRAIG; TREADWAY, 1986). Nestas circunstâncias, nossos resultados não evidenciaram essa capacidade de oxidar mais glicose no grupo T, contudo, o destreino per si foi eficiente em melhorar esse parâmetro na presença de insulina. Por bem, cabe lembrar que o grupo D apresenta um quadro de resistência periférica insulínica, que também está relacionado à menor eficiência no transporte de glicose e isto, pode estar associado a diversos fatores e mecanismos não compreendidos neste estudo. De tal forma, não sabemos ao qual ponto este quadro não influenciaria em nossos ensaios.

Tais achados nos revelam que aparentemente a via seguinte ao receptor de insulina (IR) não esta totalmente prejudicada. Acrescentando a isso, nosso ensaio pode estar sendo mascarado por um possível efeito do ambiente de resistência à insulina. No intuito de compreender quais desses fatores podem estar contribuindo

para a metabolização de glicose, a seguir discutiremos sobre alguns possíveis caminhos da glicose dentro da célula adiposa.

Para que possamos compreender melhor o metabolismo do adipócito no treinamento e destreinamento, realizamos ensaios que nos dão subsídios e informações sobre possíveis adaptações de diferentes vias metabólicas. Para tal, analisamos em nosso modelo experimental a incorporação de glicose em lipídeos e nos resíduos: ácidos graxos e glicerol do TAG (FIGURAS: 15 - 18).

Em relação à síntese de TAG, os grupos não apresentaram capacidades diferenciadas na condição basal. Na presença de insulina, no entanto, adipócitos do grupo T foram menos eficientes em incorporar glicose aos lipídios do que o grupo D. Quando avaliamos a capacidade da insulina em potencializar tal fenômeno (Δ), observamos que a resposta do grupo T foi estatisticamente menor do que os demais. Este resultado nos indica que o adipócito do animal treinado direciona a glicose para outras vias, que não seja a de incorporar em lipídios. Por outro lado, a capacidade lipogênica do adipócito no animal destreinado volta a uma condição sedentária. Comparando nossos achados com estudos anteriores de nosso grupo (SERTIÉ, 2010), podemos dizer que com 4 semanas de destreino, a célula adiposa retorna a sua capacidade lipogênica ao nível de sedentarismo, e isso se mantêm por pelo menos, período igual ao de treinamento (8 semanas).

Sabe-se que dependendo da intensidade do exercício há um aumento plasmático de lactato proveniente da metabolização de glicose, que é realizada, principalmente, no músculo (MAUGHAN; GLEESON; GREENHAFF, 2000). Quanto a isso, decidimos avaliar se o treinamento ou o destreinamento modificaria a incorporação deste substrato em lipídios. Conforme os resultados ilustrados na figura 17, o TF e a sua interrupção não modificam a capacidade do adipócito em incorporar lactato. Em paralelo a isso, nossos achados são, pelo menos em parte, semelhantes ao estudo de Borges-Silva et al. (2005), em que não constataram diferenças na síntese de lipídios a partir da glicose e lactato em ratos treinados *vs.* sedentários. Contudo, os autores não analisaram se o Δ de incorporação de glicose diferia entre os grupos. Ao buscar a literatura, encontramos alguns trabalhos mais antigos em que constataram diminuição (LAWRENCE et al., 1989; KRAL et al., 1974) e outros, que não acharam diferenças na incorporação basal da glicose em

TAG de adipócitos de animais treinados e sedentários (PALMER; TIPTON, 1974; VINTEN; GALBO, 1983). Por outro lado, quando estimulados com insulina, nestes mesmos trabalhos, verificam-se aumento em alguns casos (WARDZALA et al., 1982; VINTEN; GALBO, 1983; ASKEQ et al., 1975) e em outros, não mudam a incorporação de glicose em TAG (PALMER; TIPTON, 1974; LAERENCE et al., 1989; KRAL et al., 1974). A divergência nos resultados pode ser explicada, em parte, pela utilização de métodos e protocolos distintos, acrescentando a isso, os diferentes tipos de espécies, sexo e até mesmo as regiões dos coxins adiposos utilizados. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer este assunto, ao passo que, analisando trabalhos mais antigos que se referem somente ao treinamento, constatamos que não há um consenso na literatura, principalmente na ausência de insulina.

A síntese de AG a partir de lipoproteínas é outra importante via para a deposição de gordura no TAB. A lipogênese acontece em vários tecidos (fígado, glândula mamária, pulmões, intestino, tecido adiposo branco e marrom). Sabe-se que, em roedores, o TAB é o principal sítio da lipogênese, e contribui com aproximadamente 50% da biossíntese total de AG (FERRÉ; BAZIN, 2001). Segundo Borges-Silva et al. (2005) o treinamento aumenta a taxa de esterificação de AG, medida pela taxa de incorporação de palmitato em lipídios, e reduz a lipogênese, determinada pela diminuição da taxa basal de incorporação de acetato em lipídios. De acordo com resultados anteriores de nosso laboratório, 4 semanas são suficientes para o metabolismo do adipócito retornar aos níveis sedentários. Neste mesmo estudo, a lipogênese (medida pela incorporação de acetato) em lipídios, foi semelhante ao ensaio de glicose, em outras palavras, o treinamento reduz a lipogênese e o destreino retorna-a aos níveis sedentários.

Segundo alguns autores, no período de destreino, dependendo do tecido, a regressão aos valores pré-treinamento ou de inatividade pode ocorrer em poucos dias. Por outro lado, algumas adaptações podem ser revertidas em semanas (MUJIKA; PADILLA, 2000). No tecido hepático, por exemplo, Rector e cols. (2008) revelou que em aproximadamente 7 dias (173 horas) já a reversibilidade na taxa de oxidação e síntese de gordura de ratos OLEFT (modelo de obesidade utilizado pelos autores). Porém, algumas adaptações metabólicas do exercício permaneciam por 2 dias (53 horas). No caso do TAB, não se sabe ao certo, por quanto tempo perduraria

tais modificações causadas pelo TF. Em nosso caso, poderíamos inferir que nos dias seguintes a interrupção do treinamento, os animais destreinados poderiam sintetizar menos lipídios a partir de glicose, principalmente com o estimulo da insulina (efeito do TF), por outro lado, esses animais teriam uma maior re-esterificação de AG, contribuindo então, para o ganho de massa adiposa. Contudo, salientamos que essa é uma proposição e, portanto, somente uma avaliação mais precisa neste período poderia confirmá-la.

O papel da insulina na captação e metabolização de glicose nos tecidos insulinodependentes é bem conhecido na literatura, a sua ação se dá em um primeiro momento, por ativação de enzimas após a ligação do hormônio ao seu receptor (IR) e pela regulação (estimula ou inibe) a expressão de genes envolvidos no metabolismo celular (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). De acordo com estudos feitos por Saltiel e Kahn (2001), a insulina não atua regulando a atividade das enzimas FAS e ACC, envolvidas na síntese *de novo*, mas aumenta a expressão gênica destas proteínas. Por outro lado, estes mesmos autores revelam que a enzima citrato liase (ATP-CL) é ativada pela insulina.

Com base nessas informações e de acordo com o teste de incorporação de glicose em resíduos de AG (FIGURA 17), verificamos que à insulina foi eficaz em estimular a síntese *de novo*. Independente do estimulo máximo, verificamos em ambas as condições (basal e insulina), que a incorporação de glicose em AG nos animais D foi aumentada em relação ao grupo T. Além do que, partindo da premissa que um estímulo agudo não aumentaria o conteúdo protéico das enzimas FAS e ACC, acreditamos que os resultados de nosso ensaio de LDN estão ilustrando o papel da insulina na ativação da enzima ATP-CL. Quanto ao incremento potencializado pela insulina neste ensaio (expresso pelo Δ), não encontramos diferenças estatísticas e, com isso, acreditamos que o TF e sua interrupção não promovam alterações na via de síntese *de novo*.

Ainda sobre este ensaio, podemos observar que em todos os grupos, uma pequena fração de glicose segue para AG (aproximadamente 20-25%), em contrapartida, estudos mais antigos na literatura verificaram que o TF aumenta a capacidade do TAB em incorporar glicose no resíduo de AG do TAG e, além disso, não observaram alterações na incorporação de glicose na fração glicerol

(WARDZALA et al., 1982; GOODYEAR et al., 1991). Ao nosso ver, tal discrepância se deve, em parte, ao modelo de animal utilizado nos estudos, sendo um intolerante à glicose e o outro da linhagem Zucker.

Uma das vias de obtenção de glicerol pelo TAB é a síntese a partir de glicose, neste contexto, há uma conversão de dihidroxicetona fosfato (um intermediário da *via* glicolítica), a glicerol-3-fosfato (G3P), uma reação catalisada pela enzima G3P-desidrogenase (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). De acordo com os achados anteriores de síntese de TAG e segundo os resultados apontados no gráfico 18, a via glicolítica, mais precisamente, a de formação do glicerol, parece sofrer adaptações do TF. Isso é ilustrado pela diminuição de glicose em glicerol no grupo T em relação aos demais após estímulo de insulina (Δ). Com isso, acreditamos que a redução da massa e diâmetro da massa adiposa encontrada nos animais treinados, está relacionada a uma menor capacidade de síntese de glicerol, em outras palavras, o menor aporte de glicerol-3-fosfato, reduz a capacidade de esterificação de AG´s ao TAG, e dessa forma, resulta em uma menor capacidade lipogênica do tecido adiposo PE.

Não somos capazes de afirmar com precisão a que nível a síntese de glicerol foi alterada, mas baseados em nosso ensaio de oxidação, em que não houve alteração em relação ao grupo sedentário, podemos aventar que houve modificações nas etapas (enzimas) finais de formação do próprio glicerol. Outra hipótese a ser levantada, é que a taxa de lipogênese em si esteja reduzida no animal treinado, como evidenciado em estudos anteriores (BORGES-SILVA et al., 2005), e ao final, como avaliamos a incorporação de glicose em resíduos de TAG, parte do glicerol formado a partir de glicose deixou de ser incorporado ao lipídio, devido ao menor número de AG disponíveis e/ou formados no adipócito.

Os resultados apontados na síntese de AG, assim como o delta (Δ), não nos deixa claro se há ou não modificações do TF (DF), na síntese *de novo* neste tecido. Assim, decidimos investigar a atividade máxima de algumas enzimas envolvidas neste processo. No presente estudo, curiosamente, não verificamos diferenças na atividade máxima das enzimas FAS, G6PDH, Málica (EM) e ATP citrato-liase entre os grupos avaliados (FIGURAS 19-21). Buscando a literatura, observamos, por exemplo, que no tecido hepático o TF não alterou atividade da enzima FAS em

animais controle, mas diminuiu em ratos obesos (FIEBIG et al., 2002). Sabe-se que a atividade hepática da FAS e o seu de mRNA, reduzem após uma sessão aguda de exercícios, acompanhados por menores concentrações de insulina e maiores de glucagon no plasma, bem como um baixo conteúdo de piruvato no fígado (FIEBIG et al., 1998). Este perfil hormonal e metabólico, ocorrido durante cada sessão de treinamento e por um curto período seguinte, são fatores inibitórios para indução enzimática da síntese *de novo*. (GRIFFITHS et al., 1996). Em um recente estudo, indivíduos resistentes à insulina tiveram aumento do glicogênio muscular, redução do conteúdo de TAG e na taxa de lipogênese *de novo* hepática após uma única sessão de exercício (RABOL et al., 2011)

Podemos inferir que, como citado anteriormente, a insulina não promova alteração na atividade e sim, na expressão e conteúdo de algumas destas enzimas (SALTIEL; KAHN, 2001). Nesse sentido, visto que os animais S e T apresentavam concentrações séricas iguais deste hormônio, e os nossos ensaios não evidenciaram aumento na sensibilidade à insulina, por isso, é provável que a atividade destas enzimas esteja co-relacionada à concentração plasmática de insulina do próprio animal, bem como, sua ação de transcrição. No caso dos animais do grupo D, constatamos um aumento na oxidação de glicose, disponibilizando substratos que podem ser utilizados para a síntese *de novo* no adipócito. Além do que, o quadro de resistência periférica e o aumento da insulina plasmática, podem estar mascarando a transcrição e síntese das enzimas. No entanto, cabe lembrar que é uma suposição e que tal hipótese deve ser melhor investigada.

Em uma revisão de Stallknecht (2004), o autor sugere que o aumento na atividade de enzimas responsáveis pela síntese de TAG, talvez seja a explicação de alguns trabalhos apontarem que o treinamento melhora a capacidade dos adipócitos em incorporar glicose em TAG. No entanto, neste mesmo estudo verificamos muitos trabalhos em que a cinética enzimática de enzimas lipogências não é alterada com o TF. Essa discrepância nos achados pode ser visualizada também em trabalhos mais antigos. Askew et al. (1975), analisaram a atividade da G6PDH e EM na gordura PE de ratos treinados e sedentários. Verificaram que atividade da G6PDH diminuiu e a EM não se alterou. Em outras palavras, nenhum aumento no potencial lipogênico do tecido adiposo foi observado em resposta ao treinamento. Entretanto, ele verificou que atividade da síntese de glicerídeos (GS) aumentou, e com isso, concluiu que os

ratos treinados podem ter uma maior capacidade de armazenamento do glicerol de TAG, mas não de sintetizar AG. No trabalho de Tsai et al.(1982), verificaram a atividade lipogênica *in vivo* hepática e do TAB perirenal de hamsters fêmeas em diferentes períodos, entre eles: após realizarem 35 dias de exercícios voluntários e 8 e 41 dias seguintes a sua interrupção. Constataram que os animais exercitados tiveram aumento na síntese de AG tanto no fígado, quanto no TAB, entretanto, no período de destreino, mais especificamente nos 8 primeiros dias, a atividade lipogênica do TA começou a reduzir gradativamente, enquanto que no fígado, a síntese de AG aumentou. No período final (41º dia de destreino), a atividade lipogênica de ambos os tecidos voltaram aos níveis sedentários. Ainda neste estudo, não constataram diferenças na atividade na maioria das enzimas lipogênicas do TAB, por outro lado, no fígado tiveram sua atividade máxima aumentada. Com isso, o autor conclui que os animais tiveram um aumento na atividade lipogênica, principalmente hepática, e isso contribuiu para o rápido ganho de gordura. Dessa forma, acreditamos novamente que os métodos utilizados (raça, sexo, tecidos e depósitos de gordura), podem ter contribuído para a variabilidade dos resultados, além do mais, nestes estudos não foram mostrados dados referentes à concentração sérica de insulina, o que dificulta analisar e compará-los com o nosso.

6 CONCLUSÕES

Por tanto, o presente estudo, juntamente com resultados prévios de nosso grupo, evidenciam que o TF reduz a massa e tamanho do TAB e que o destreino reverte este fenômeno. Além do mais, nossos achados descartam a hipótese levantada de que, num período maior, o destreino acarretaria aumento no número de adipócitos e, portanto, na possibilidade de isso se repercutir na massa e coxim do tecido.

Em síntese, os animais do grupo T apresentam redução na massa e diâmetro dos coxins adiposos e no caso da gordura PE, isto não se deu por adaptações na via lipolítica da célula adiposa. Por outro lado, o treinamento *per se* reduz a capacidade do adipócito em sintetizar TAG a partir de glicose, e que essa redução se fez na formação de glicerol. Assim, o menor diâmetro e massa adiposa PE, se

deu, pela menor capacidade lipogênica. O grupo D, por sua vez, teve capacidade de síntese igual aos controles e regrediu aos níveis sedentários.

Dessa forma, nossos resultados contribuem, pelo menos em parte, para o princípio de reversibilidade no metabolismo do TAB. Ao passo que, no que tange a síntese de TAG a partir de glicose, este trabalho corrobora com estudos anteriores de nosso laboratório, em que 4 semanas de inatividade física reverte as adaptações metabólicas decorrentes do TF e o prolongamento deste período (8 semanas) não acarreta em possíveis modificações no coxim e no metabolismo do adipócito. No entanto, a manutenção do destreinamento físico proporciona um quadro de resistência à insulina e conseqüentemente, aumento nos níveis séricos deste hormônio. A menor capacidade da insulina em transportar glicose para o adipócito pode estar contribuindo para o desbalanço na homeostase glicêmica. Por outro lado, nossos resultados dão indícios de que a via da sinalização da insulina não está totalmente prejudicada, e que pode haver um possível efeito residual deste fenótipo em nossos testes.

REFERÊNCIAS

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

ALMÉRAS, N. et al. Fat gain in female swimmers. **Physiol Behav,** v. 61, n. 6, p. 811-7, 1997.

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. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.

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, n. 2, p. 447-59, 1984.

ARCIERO, P. J.; SMITH, D. L.; CALLES-ESCANDON, J. Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. **J Appl Physiol,** v. 84, n. 4, p. 1365-73, Apr 1998.

ARNOLD, J.; RICHARD, D. Detraining of exercise-trained rats: effects on energetic efficiency and brown adipose tissue thermogenesis. **Br J Nutr,** v. 57, n. 3, p. 363-70, 1987.

ASKEQ, E. W. et al. Lipogenesis and glyceride synthesis in the rat: response to diet and exercise. **J Nutr,** v. 105, n. 2, p. 190-9,1975.

BARBARA J. NICKLAS AND DORA M. BERMAN. Exercise and adipose tissue lipolysis in vitro. In: Endurance exercise and adipose tissue, 2001.

BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. Bioquímica Médica. 1 ed, Ed. Elsevier, 2007.

BAZIN, R. AND FERRÉ, P. Assays of Lipogenic Enzymes. Methods in Molecular Biology, vol. 155: Adipose Tissue Protocols; 2001.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. D- glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer H. U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, London, 1196-1201, 1974.

BORGES-SILVA, C. N. et al. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **J Pineal Res,** v. 38, n. 4, p. 278-83, 2005.

BORGES-SILVA, C. N. et al. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. **J Pineal Res,** v. 39, n. 2, p. 178-84, 2005

BURSTEIN, R. et al. Acute reversal of the enhanced insulin action in trained athletes. Association with insulin receptor changes. **Diabetes,** v. 34, n. 8, p. 756-60, 1985.

CLIFFORD, G. M. et al. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. **J Biol Chem,** v. 275, n. 7, p. 5011-5, Feb 2000.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Prog Lipid Res,** v. 43, n. 2, p. 134-76, 2004.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. [Adipose tissue and adipokines]. **Acta Med Port,** v. 19, n. 3, p. 251-6, 2006.

COYLE, E. F. et al. Effects of detraining on responses to submaximal exercise. **J Appl Physiol,** v. 59, n. 3, p. 853-9, 1985.

CRAIG, B. W. et al. Adaptation of fat cells to exercise: response of glucose uptake and oxidation to insulin. **J Appl Physiol,** v. 51, n. 6, p. 1500-6, 1981.

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, n. 2, p. 571-5, 1983.

CRAIG, B. W.; FOLEY, P. J. Effects of cell size and exercise on glucose uptake and metabolism in adipocytes of female rats. **J Appl Physiol,** v. 57, n. 4, p. 1120-5, 1984.

CRAIG, B. W.; TREADWAY, J. Glucose uptake and oxidation in fat cells of trained and sedentary pregnant rats. **J Appl Physiol,** v. 60, n. 5, p. 1704-9, 1986.

CRAIG, B. W.; GARTHWAITE, S. M.; HOLLOSZY, J. O. Adipocyte insulin resistance: effects of aging, obesity, exercise, and food restriction. **J Appl Physiol,** v. 62, n. 1, p. 95-100, 1987.

CRAIG, B. W. et al. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. **Mech Ageing Dev,** v. 57, n. 1, p. 49-61, 1991.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol,** v. 111, n. 9, p. 2015-23, 2011.

DE GLISEZINSKI, I. et al. Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue. **J Physiol,** v. 587, n. Pt 13, p. 3393-404, 2009.

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

ENEVOLDSEN, L. H. et al. Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 279, n. 3, p. E585-92, 2000.

EVANGELISTA, F. S.; BRUM, P. C. Effects of Physical Detraining on Athlete Performance: A Review About Skeletal Muscle and Cardiovascular Changes**. Rev. paul. Educ. Fís.**, São Paulo, v. 13. n.2, p. 239-49, 1999.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol,** v. 115, n. 5, p. 911-9; quiz 920, 2005.

FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. **Horm Res,** v. 68, n. 2, p. 72-82, 2007.

FERRÉ, P; BAZIN, R. Assays of Lipogenic Enzymes. Methods in Molecular Biology, vol. 155: Adipose Tissue Protocols; 2001.

FIEBIG, R. et al. Exercise training down-regulates hepatic lipogenic enzymes in meal-fed rats: fructose versus complex-carbohydrate diets. **J Nutr,** v. 128, n. 5, p. 810-7, 1998.

FINE, J. B.; DIGIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 21, n. 9, p. 764-8, 1997.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J; et.al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq.Bras.Endroci.Metab**, v.50, n.2. 2006.

FRAYN, K.N., **Metabolic Regulation: A Human Perspective**, Portland Press, London, 1996.

FRAYN, K.N., Studies of human adipose tissue in vivo, in **Energy Metabolism: Tissue Determinants and Cellular Corollaries**. J.M. Kinney and H.N. Tucker, Eds., Raven Press, New York, 1992.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell,** v. 131, n. 2, p. 242-56, 2007.

GLISEZINSKI, DE I; LARROUY. D. Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue**. J Physiol**. v. 587. n. 13, p. 3393–3404, 2009.

GOLLNICK, P.D., MOORE, R.L., RIEDY, M., QUINTINSKIE J.J. Significance of Skeletal Muscle Oxidative Changes with Endurance Training and Detraining. Medicine Sports Sci., v. 17, p. 215-229, 1984.

GOODPASTER, B. H., HE, J., WATKINS, S., AND KELLEY, D. E. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v. 86, p. 5755–5761, 2001.

GOODYEAR, L. J. et al. Exercise training normalizes glucose metabolism in a rat model of impaired glucose tolerance. **Metabolism,** v. 40, n. 5, p. 455-64, 1991a.

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

GRIFFITHS, M. A. et al. Exercise down-regulates hepatic lipogenic enzymes in food-deprived and refed rats. **J Nutr,** v. 126, n. 8, p. 1959-71, 1996.

HEIDARIANPOUR, A. Does detraining restore influence of exercise training on microvascular responses in streptozotocin-induced diabetic rats? **Microvasc Res,** v. 80, n. 3, p. 422-6, 2010.

HILLGARTNER, F. B.; SALATI, L. M.; GOODRIDGE, A. G. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. **Physiol Rev,** v. 75, n. 1, p. 47-76, 1995.

HOFFMAN, JAY. **Physiological Aspects of Sport Training and Performance**. Editora Human Kinetics, 2002.

HOLLOWAY, G. P. Mitochondrial function and dysfunction in exercise and insulin resistance. **Appl Physiol Nutr Metab,** v. 34, n. 3, p. 440-6, 2009.

HOROWITZ, J. F.; KLEIN, S. Lipid metabolism during endurance exercise. **Am J Clin Nutr,** v. 72, n. 2 Suppl, p. 558S-63S, 2000.

HOST, H. H. et al. Rapid reversal of adaptive increases in muscle GLUT-4 and glucose transport capacity after training cessation. **J Appl Physiol,** v. 84, n. 3, p. 798-802, 1998.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science,** v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOUMARD, J. A. et al. Training cessation does not alter GLUT-4 protein levels in human skeletal muscle. **J Appl Physiol,** v. 74, n. 2, p. 776-81, 1993.

JACOB, S. et al. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. **Diabetes,** v. 48, n. 5, p. 1113-9, 1999.

JAWORSKI, K. et al. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v. 293, n. 1, p. G1-4, 2007.

JEFFREY FH, KLEIN S. Lipid metabolism during endurance exercise**. Am. J. Clin. Nutr**, v72: p.558-563, 2000.

KOVACS, E. M.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Effects of (-)-hydroxycitrate on net fat synthesis as de novo lipogenesis. **Physiol Behav,** v. 88, n. 4-5, p. 371-81, 2006.

KRAL, J. G. et al. The effects of physical exercise on fat cell metabolism in the rat. **Acta Physiol Scand,** v. 90, n. 4, p. 664-72, 1974.

KREIER, F. et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. **J Clin Invest,** v. 110, n. 9, p. 1243-50, 2002.

KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Sustained rise in triacylglycerol synthesis and increased epididymal fat mass when rats cease voluntary wheel running. **J Physiol,** v. 565, n. Pt 3, p. 911-25, 2005.

LAMBERT, E. V. et al. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. **J Appl Physiol,** v. 77, n. 6, p. 2564-71, 1994.

LAMBERT, E. V., WOODING, G., LAMBERT, M. I., KOESLAG, J. H. & NOAKES, T. D. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. **J Appl Physiol** v. 7. p. 2564-2571, 1994.

LAWRENCE, J. C. et al. Effects of aging and exercise on insulin action in rat adipocytes are correlated with changes in fat cell volume. **J Gerontol,** v. 44, n. 4, p. B88-92, 1989.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care,** v. 13, n. 4, p. 371-6, 2010.

LEEK, B. T. et al. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 280, n. 2, p. R441-7, 2001.

LEEK, B. T., MUDALIAR, S. R., HENRY, R., MATHIEU-COSTELLO, O. & RICHARDSON, R. S. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. V. 280, p. 441-447, 2001.

LEHNEN, A. M. et al. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovasc Diabetol,** v. 9, p. 67, 2010.

LEHNINGER, A.L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, 1982.

LETEXIER, D. et al. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. **J Lipid Res,** v. 44, n. 11, p. 2127-34, 2003.

LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R.; HERMANS, M. P. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. **Diabetes Care,** v. 21, n. 12, p. 2191-2, 1998.

LIMA, F. B. et al. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. **Braz J Med Biol Res,** v. 27, n. 4, p. 995-1000, 1994.

LIU, T. C. et al. Effects of short-term detraining on measures of obesity and glucose tolerance in elite athletes. **J Sports Sci,** v. 26, n. 9, p. 919-25, 2008.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol,** v. 147, n. 1, p. 149-57, 2002.

MADSEN, K. et al. Effects of detraining on endurance capacity and metabolic changes during prolonged exhaustive exercise. **J Appl Physiol,** v. 75, n. 4, p. 1444-51, 1993.

MAUGHAN R, GLEESON M, GREENHAFF PL. **Bioquímica do Exercício e do Treinamento**. São Paulo: Manole, 2000.

MCCOY, M., PROIETTO, J. AND HARGREVES, M. Effect of training cessation on GLUT-4 protein in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol**. V. 77, p. 1532–1536, 1994.

MERSMANN, H. J. Lipoprotein and hormone-sensitive lipases in porcine adipose tissue. **J Anim Sci,** v. 76, n. 5, p. 1396-404, 1998.

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

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. **Sports Med,** v. 30, n. 2, p. 79-87, 2000.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Cardiorespiratory and metabolic characteristics of detraining in humans. **Med Sci Sports Exerc**. v. 33. p. 413, 2001.

NAGASAWA, J.; MURAOKA, I.; SATO, Y. Long-lasting effect of training on insulin responsiveness in the rat. **Int J Sports Med,** v. 16, n. 2, p. 91-3, 1995.

NEWSHOLME, E. A.; WILLIAMS, T. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in amino acid metabolism in muscle. **Biochem J,** v. 176, n. 2, p. 623-6, 1978.

NOGALSKA, A. et al. The age-related inverse relationship between ob and lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. **Exp Gerontol,** v. 38, n. 4, p. 415-22, 2003.

NOMURA, S. et al. Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 295, n. 2, p. 236-42, 2002.

NORRBOM, J. et al. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. **J Appl Physiol,** v. 96, n. 1, p. 189-94, 2004.

O'DONOVAN, G. et al. The effects of 24 weeks of moderate- or high-intensity exercise on insulin resistance. **Eur J Appl Physiol,** v. 95, n. 5-6, p. 522-8, 2005.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol,** v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

PALMER, W. K.; TIPTON, C. M. Effect of training on adipocyte glucose metabolism and insulin responsiveness. **Fed Proc,** v. 33, n. 8, p. 1964-8, 1974.

PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 14, p. 8466-71, 2003.

PAULI, J. R.; et al. Mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulina em animais destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídies. Motriz. **Rev de Educ Fís**. UNESP, Rio Claro, v. 13, p. S19-S28, 2007.

PÉNICAUD, L. et al. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. **Nutrition,** v. 16, n. 10, p. 903-8, 2000.

PERES, S. B. et al. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **J Appl Physiol,** v. 98, n. 3, p. 1037-43, 2005.

PERSEGHIN, G. et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. **Diabetes,** v. 48, n. 8, p. 1600-6, 1999.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest,** v. 106, n. 2, p. 165-9, 2000.

PETIBOIS, C. et al. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 89, n. 7, p. 3377-84, 2004.

REBECCA J. TUNSTALL, KATE A. MEHAN, et.al; Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. **Am J Phy Endo Metab**. v. 283: p. E66–E72, 2002.

RECTOR, R. S. et al. Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. **J Physiol,** v. 586, n. Pt 17, p. 4241-9, 2008.

REYNOLDS, T. H. et al. Transient enhancement of GLUT-4 levels in rat epitrochlearis muscle after exercise training. **J Appl Physiol,** v. 88, n. 6, p. 2240-5, 2000.

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

RODNICK, K. J. et al. Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. **Am J Physiol,** v. 253, n. 5 Pt 1, p. E489-95, 1987.

RODNICK, K. J., HASKELL, W. L., SWISLOCKI, A. L., FOLEY, J. E. & REAVEN, G. M. Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. **Am J Physiol** v. 253, p. E489-495, 1987.

ROGERS, M. A. et al. Effect of 10 days of physical inactivity on glucose tolerance in master athletes. **J Appl Physiol,** v. 68, n. 5, p. 1833-7, 1990.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature,** v. 444, n. 7121, p. 847-53, 2006.

RUSSELL, A. P. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 28 Suppl 4, p. S66-71, 2004.

SAKURAI, T. et al. Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. **Acta Physiol (Oxf),** v. 200, n. 4, p. 325-38, 2010.

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

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

SERTIÉ, R. A. L. Repercussões do destreinamento físico sobre o metabolismo e a celularidade do tecido adiposo branco periepididimal de ratos. São Paulo, 2010. Tese de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

SHEPHERD, P. R. et al. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. **J Biol Chem,** v. 268, n. 30, p. 22243-6, 1993.

SIMSOLO, R. B.; ONG, J. M.; KERN, P. A. The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. **J Clin Invest,** v. 92, n. 5, p. 2124-30, 1993.

SJOGAARD, G. Changes in Skeletal Muscles Capillarity and Enzyme Activity with Training and Detraining. **Med Sport Sci**., v. 17, p. 202-214, 1984.

STALLKNECHT, B. Effects of acute endurance exercise and physical training on glucose metabolism in white adipose tissue. In: **Endurance exercise and adipose tissue**, 2001.

STALLKNECHT, B. Influence of physical training on adipose tissue metabolism--with special focus on effects of insulin and epinephrine. **Dan Med Bull,** v. 51, n. 1, p. 1-33, 2004.

SUMMERMATTER, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} coactivator 1{alpha} (PGC-1{alpha}) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. **J Biol Chem,** v. 285, n. 43, p. 32793-800, 2010.

TANSEY, J. T. et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 11, p. 6494-9, 2001.

TERAN-GARCIA, M. et al. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 288, n. 6, p. E1168-78, 2005.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc,** v. 60, n. 3, p. 329-39, 2001.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans,** v. 33, n. Pt 5, p. 1078-81, 2005.

TSAI, A. C.; ROSENBERG, R.; BORER, K. T. Metabolic alterations induced by voluntary exercise and discontinuation of exercise in hamsters. **Am J Clin Nutr,** v. 35, n. 5, p. 943-9, 1982.

TUNSTALL, R. J. et al. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 283, n. 1, p. E66-72, 2002.

VINTEN, J.; GALBO, H. Effect of physical training on transport and metabolism of glucose in adipocytes. **Am J Physiol,** v. 244, n. 2, p. E129-34, 1983.

WARDZALA, L. J. et al. Physical training of lean and genetically obese Zucker rats: effect on fat cell metabolism. **Am J Physiol,** v. 243, n. 5, p. E418-26, 1982.

WARNE, J. P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **J Endocrinol,** v. 177, n. 3, p. 351-5, 2003.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. **Fisiologia Humana: os mecanismos das funções corporais**. Tradução de Vander, Sherman, Luciano. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 588 Tradução de: Human physiology: the machanisms of body function, 9th ed, 2006.

WILLIAMS, P. T.; THOMPSON, P. D. Dose-dependent effects of training and detraining on weight in 6406 runners during 7.4 years. **Obesity (Silver Spring),** v. 14, n. 11, p. 1975-84, 2006.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Physiology of Sport and Exercise**. Humans Kinetics, 2, 1999.

YASARI, S. et al. 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. 281-9, 2007.

ZABALA, A. et al. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. **Br J Nutr,** v. 95, n. 6, p. 1112-9, 2006.

ZECHNER R, STRAUSS J, FRANK S, WAGNER E, HOFMANN W, KRATKY D, et al. The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. **Int J Obes Relat Metabol Disord**. v. 24, p. S53-S56, 2000

ZIMMERMANN, R. et al. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. **Biochim Biophys Acta,** v. 1791, n. 6, p. 494-500, 2009

ANEXOS

Anexo A – tabelas de resultados

PESO CORPORAL	S	T	D
Peso inicial	134±3,67	131±2,78	137±2,76
Peso final	392±9,29	378±8,84	380±9,89
Ganho de peso (destreino)	69,64±4,54	57,80±5,19	77,60±3,00#

(#) vs T. (p<0,05)

COMPOSIÇÃO CORPORAL	S	T	D
Lipídios	24,31±1,12	19,49±0,91*	24,53±1,31#
Massa magra	75,69±1,12	80,51±0,91*,**	75,47±1,31

(*) vs. S; (**) vs D.; (#) vs. T (p<0,05)

ANÁLISE MORFOLÓGICA (PE)	S	T	D
Diâmetro PE	80,68±1,56	73,61±1,51*	82,52±2,35#
Nº adipócitos	1,869±0,08 $x10^{-7}$	2,024±0,11 $x10^{-7}$	1,913±0,13 $x10^{-7}$

ATIVIDADE ENZIMÁTICA	S	T	D
Citrato sintase	176,4±8,61	241,2±11,66*	211,5±5,89
FAS	30,00± 2,99	38,49±2,96	36,48±3,99
G6PDH	169,2± 26,11	181,5± 18,81	188,8±20,70
EM	75,69± 7,14	81,84± 8,53	69,35±3,91

DOSAGENS BIOQUÍMICAS	S	T	D
Glicose	131,9± 4,89	127,2±5,08	141,2±6,21
Colesterol total	53,18± 1,97	45,22±1,20*	51,65±1,85
Triglicérides	38,81± 5,14	32,02±2,63	35,22±2,57

(*) p<0,05 vs. demais (S e D)

DOSAGENS HORMONAIS	S	T	D
Insulina	1,204±0,131	1,197±0,134	1,678±0,164
$HOMA_{IR}$	0,38±0,045	0,37±0,047	0,56±0,068**

(*)p<0,05 vs. S; (**)p<0,05 vs. demais (S e T)

Ensaios biológicos	S	T	D
Lipólise			
bs.	4008±550	3256±396	4096±457
Iso.	6470±719**	5580±680**	6779±879**
Δ	2462±349	2324±352	2981±416
Transporte glicose			
bs.	950,1±95,73	971,8±67,89	921,1±60,21
iso.	1438±149,0**	1345±83,04**	1175±88,24**
Δ	516±72,72	373±31,62	254±40,65*
Oxidação glicose			
bs.	52,49±5,07	56,14±10,06	75,23±10,82
ins.	75,40±5,74**	80,35±12,19**	110,9±15,82* **
Δ	22,91±2,69	26,27±3,32	38,66±6,11*
Lipogênese glicose			
bs.	241,6±29,54	194,0±23,56	268,1±29,04
ins.	371,1±36,66**	304,6±32,33**	415,5±39,05** #
Δ	134,7± 11,40	92,29±10,65*	147,4±16,22#
Lipogênese lactato			
bs.	441,6±40,64	415,9±28,15	501,5±48,41
Incorp. glicose em AG			
bs.	55,55±3,70	44,97±4,83	64,35±6,10#
ins.	64,47±5,85**	57,33±-4,13**	79,08±6,93# **
Δ	9,14±3,35	12,36±2,66	14,73±2,87
Incorp. glicose em glicerol			
bs.	160,1±13,12	150,4±20,38	216,4±-22,11
ins.	277,4±20,39**	244,4±27,23**	350,4±-33,41# **
Δ	117,3±9,97	78,67±8,82*	134,0±16,46#

(*) vs. S; (#) vs. T; (**) vs. situação basal (p<0,05)

Anexo B – protocolo treinamento

Semanas/dias	Tempo	Velocidade (A-T)[1]	Semanas/dias	Tempo	Velocidade (A-T)[1]
INÍCIO TREINAMENTO FÍSICO					
1ª Semana	**MIN.**	**KM/H**	**5ª Semana**	**MIN.**	**KM/H**
S	10	0,3-0,5	S	**40**	0,4-0,7
T	15	0,3-0,5	T	**60**	0,4-0,8
Q	20	0,3-0,5	Q	**40**	0,4-0,8
Q	25	0,3-0,5	Q	**60**	0,4-0,8
S	25	0,4-0,6	S	**60**	0,4-0,9
2ª Semana			**6ª Semana**		
S	25	0,3-0,5	S	**40**	0,4-0,8
T	30	0,3-0,6	T	**60**	0,4-0,9
Q	30	0,3-0,6	Q	**50**	0,4-0,8
Q	35	0,4-0,6	Q	**60**	0,4-0,9
S	40	0,4-0,6	S	**60**	0,4-0,9
3ª Semana			**7ª Semana**		
S	35	0,4-0,6	S	**40**	0,4-0,9
T	40	0,4-0,6	T	**60**	0,4-0,9
Q	35	0,4-0,6	Q	**50**	0,4-0,8
Q	45	0,4-0,6	Q	**60**	0,4-1,0
S	50	0,4-0,6	S	**60**	0,4-1,0
4ª Semana			**8ª Semana**		
S	40	0,4-0,6	S	**40**	0,4-0,8
T	45	0,4-0,6	T	**60**	0,4-1,0
Q	50	0,4-0,6	Q	**50**	0,4-0,9
Q	50	0,4-0,7	Q	**60**	0,4-1,0
S	55	0,4-0,7	S	**60**	0,4-1,1
INÍCIO PERÍODO DESTREINAMENTO FÍSICO					
9ª Semana	MIN.	**KM/H**	**13ª Semana**	**MIN.**	**KM/H**
S	40	0,4-0,8	S	**40**	0,4-0,8
T	60	0,4-0,9	T	**60**	0,4-0,9
Q	50	0,4-0,9	Q	**50**	0,4-1,0
Q	60	0,4-1,0	Q	**60**	0,4-0,8
S	60	0,4-1,1	S	**60**	0,4-1,2
10ª Semana			**14ª Semana**		
S	40	0,4-0,8	S	**40**	0,4-0,8
T	60	0,4-0,9	T	**60**	0,4-1,0
Q	50	0,4-0,9	Q	**50**	0,4-1,1
Q	60	0,4-1,0	Q	**60**	0,4-0,8
S	60	0,4-1,1	S	**60**	0,4-1,2
11ª Semana			**15ª Semana**		
S	40	0,4-0,8	S	**40**	0,4-0,8
T	60	0,4-0,9	T	**60**	0,4-1,0
Q	50	0,4-0,9	Q	**50**	0,4-1,1
Q	60	0,4-1,0	Q	**60**	0,4-0,8
S	60	0,4-1,1	S	**60**	0,4-1,2
12ª Semana			**16ª Semana**		
S	40	0,4-0,8	S	**40**	0,4-0,8
T	60	0,4-0,9	T	**60**	0,4-1,0
Q	50	0,4-1,0	Q	**50**	0,4-1,1
Q	60	0,4-0,9	Q	**60**	0,4-0,8
S	60	teste	S	**60**	0,4-1,2

[1] A=velocidade média aquecimento e recuperação; T=velocidade média de treino