LUÍS GUSTAVO OLIVEIRA DE SOUSA

**VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NA RESISTÊNCIA À
INSULINA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA: EFEITO DA
SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E DO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2015

LUÍS GUSTAVO OLIVEIRA DE SOUSA

**VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NA RESISTÊNCIA À
INSULINA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA: EFEITO DA
SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E DO TREINAMENTO
FÍSICO AERÓBICO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara

Versão original

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Sousa, Luís Gustavo Oliveira de.

Vias de síntese e degradação de proteínas na resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica: efeitos da suplementação com ácidos graxos ômega-3 e do treinamento físico aeróbico / Luís Gustavo Oliveira de Sousa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Obesidade, treinamento físico aeróbico, óleo de peixe, resistência à insulina.

Versão do título para o inglês: Protein synthesis and degradation pathways on insulin resistance induced by high fat diet: the effect of omega-3 fatty acids supplementation and aerobic exercise training.

1. Obesidade 2. Músculo esquelético 3. Treinamento aeróbico 4. Óleo de peixe 5. Resistência à insulina 6. Síntese proteica I. Hirabara, Prof. Dr. Sandro Massao II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0138/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luís Gustavo Oliveira de Sousa.

Título da Tese: Vias de síntese e degradação de proteínas na resistência à
insulina induzida por dieta hiperlipídica: efeitos da
suplementação com ácidos graxos ômega-3e do
treinamento físico aeróbico.

Orientador(a): Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**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 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 039.13

São Paulo, 11 de junho de 2013.

REF.: Protocolo nº 032/10.

"Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e do exercício físico regular sobre a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 05.04.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo. Sr.
Prof Dr. Rui Curi
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade concedida.

Aos meus pais Vilma Araújo Oliveira e Paulo Fernando de Sousa, por todo apoio e incentivo aos meus estudos e por toda educação, o qual foi me dada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara, por acreditar no meu trabalho e por todos os ensinamentos ao longo desses quase 5 anos de convivência. Meu eterno agradecimento!!

A Rosana Prisco, por sua fundamental contribuição com a análise estatística, por sua simpatia, incentivo e amizade.

Ao meu irmão Paulo Fernando de Sousa, Samara Fernandes, Ana Cristina e Carolzinha pelo apoio e no cuidado com o meu filhote Jimi Hendrix nesse um ano que eu estive fora do país.

Aos meus tios José Bonifácio, Maria Luiza e Lêda Araújo pelo incentivo constante e apoio em todos os momentos do meu ciclo na pós-graduação.

Aos meus grandes amigos do Recife, Geyson Miranda, Felipe Pit, Ruy de Araújo, Mário de Siqueira Alves Filho, Claudio de Oliveira Assunção, Sérgio Luiz Cahú Rodrigues, e todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação pessoal e profissional.

As minhas maiores incentivadoras na área acadêmica, professoras Dras. Francisca Martins Bion (Francisquinha) e Rosa Idalina por acreditarem em mim no início de tudo e por me darem a oportunidade de dar os meus primeiros passos na ciência.

Aos amigos do laboratório, Renato Nachbar, Caio Vetzal, Laureane Nunes Masi, Gabriel Marzuca, Roberto Mendonça e todos os outros colegas que me ajudaram de alguma forma na conclusão do meu trabalho final.

A Professora Dra. Alice Cristina Rodrigues, por sua amizade e por sempre me ajudar quando eu precisei.

A professora Dra. Marília Seelaender e a sua técnica, Emília Ribeiro, por sempre me apoiarem e abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender e fazer os meus experimentos de histologia.

Ao professor Dr. José Cesar Rosa Neto (Zeca) e Edson (Edinho) pelo convívio e aprendizado durante os últimos anos.

Aos meus amigos, Luiz Roberto Grassmann Bechara, Emerson Franchini, Carlos Roberto Bueno Júnior, Clevérton José, Wilson Max, Katherine Veras, Maria Carmen, Jimi e Maggie por terem contribuído na minha formação profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Rui Curi, por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

A professora Dra. Tânia Curi, pela oportunidade de ministrar aulas na UNICSUL e a todos os membros do ICAFE (Unicsul).

À professora Dra. Sue Cristine Bodine, por toda a sua contribuição para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, pelo seu caráter, simpatia e incentivo constante e por me mostrar que é possível fazer pesquisa de qualidade e se divertir ao mesmo tempo.

Aos membros do *Bodine Lab* da UCDAVIS, Andrea Marshall, Leslie Baehr, Piya Siripokisup, Justin duong, Kevin Nasre, Parisi, Teja e Ian rhodes, pela oportunidade única que foi me dada e por me incentivar a sempre querer mais

Ao professor Dr. Keith Baar pelo excelente ano de discussões e aprendizados constantes e por me mostrar que o senso crítico, trabalho e força de vontade são fundamentais para a melhora do nível científico e pessoal (*We work hard because we love what we do!!*).

Aos membros do *Baar Lab*, Kurt Watson, Dan West, Whitney Vuong, Dave Hughes, Courtney Chason, Marita Wallace, George Marcotte, Ann Lee e Nick Aguirre pelo excelente ano de muito trabalho, rizadas e aprendizado e onde fui muito feliz.

Ao professor Dr. Aldrin Gomes e suas alunas Jennifer Gilda e Rajeshwary Ghosh pelo agradável convívio e por todo suporte que me deram durante o meu período em Davis.

A Rita Robinett Lundin, Maggie e Cris Lundin, pela excelente recepção em sua casa e agradável convívio de 1 ano em Davis, Califórnia e por me ensinar muito sobre como aproveitar a vida e ser feliz com pouco.

Aos novos amigos da arte suave que fiz em Sacramento, california. Ao mestre André Glodzinski e a sua esposa Scatha Allisson, Nickolaus Knight, Manny Moreno, Austin Rosas, John Cardoza, Julia Matsieva, Maury Rosas, Chuy Moreno, Ahmad Taleb, Josh Spangler, Richard Sharke e a todos da Cia Paulista de Jiu jitsu pela excelente recepção, aprendizado e bons momentos de treino.

Aos funcionários da biblioteca, pelo apoio constante na revisão da tese.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (#Processo 2010/18921-7).

"The World Is a Book and Those Who Do Not Travel Read Only One Page"

St. Augustine

RESUMO

SOUSA, L. G. Vias de síntese e degradação de proteínas na resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica: efeito da suplementação com ácidos graxos ômega-3 e do treinamento físico aeróbico. 2015. 99 f. tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os efeitos da obesidade no músculo esquelético estão relacionados com o desenvolvimento da resistência à insulina (RI), diabetes e piora da qualidade de vida. Trabalhos recentes tem demonstrado que a dieta hiperlipídica (DHL) diminui a capacidade de crescimento do músculo esquelético. Este efeito negativo está relacionado à diminuição na ativação da via Akt/mTOR contribuindo para o desenvolvimento da resistência anabólica (RA). Por outro lado, estudos têm demonstrado um possível efeito benéfico da suplementação com o ácido graxo poliinsaturado ômega 3 (Ag-W3) e do treinamento físico aeróbico (TA) na prevenção e tratamento da RA. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com Ag-W3, do TA e da associação Ag-W3/TA nas vias de síntese e degradação de proteínas de camundongos com obesidade induzida por DHL. Os animais alimentados com DHL tiveram pior desempenho na distância total percorrida, atividade reduzida das enzimas citrato sintase e catepsina L, e diminuição da proteína Akt em comparação ao grupo alimentado com dieta balanceada (DB). Não houve alteração nas proteínas S6k, 4EBP1, MuRF1, MAFbx e no Proteassoma $\beta 5$ nos animais obesos em relação aos animais submetidos a DB sedentários, indicando que o processo de síntese proteica no músculo gastrocnêmio não foi afetado. O tratamento com o Ag-W3 e TA isoladamente foram capazes de atenuar alguns parâmetros, tais como, ganho de peso, depósitos de gordura e glicemia de jejum. Porém, só o TA restaurou a insulinemia de jejum, melhorando a RI. Além disso, o TA melhorou o desempenho (distância total), aumentou a atividade da enzima citrato sintase e expressão de PGC1 α , independentemente da suplementação com o Ag-W3, sugerindo uma melhora do metabolismo oxidativo. Em conclusão, o TA promove um efeito protetor na obesidade e RI, contribuindo para a manutenção da homeostase do músculo gastrocnêmio de camundongos obesos, independente da suplementação com o Ag-W3.

Palavras-chave: Obesidade. Músculo esquelético. Treinamento físico aeróbico. Óleo de peixe. Resistência à insulina. Síntese proteica.

ABSTRACT

SOUSA, L.G. **Protein synthesis and degradation pathways in insulin resistance induced by high fat diet: The effect of omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise training.** 2015. 99 p. Ph. D. thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The effects of obesity on skeletal muscle are correlated with insulin resistance (IR), diabetes and decreased of quality of life. Recent work has demonstrated that a high fat diet (HFD) decreases the ability of skeletal muscle to hypertrophy in a model of increased mechanical load. This negative effect on muscle growth is correlated with a decrease in activation of the Akt/mTOR signaling pathway, contributing to the development of anabolic resistance (AR). Furthermore, studies have demonstrated a possible effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and aerobic exercise training (AET) on prevention and treatment of obesity and IR. The objective of the present study was to evaluate the effects of PUFA supplementation, AET, and association PUFA/AET on protein synthesis and degradation pathways in mice with obesity induced by HFD. Animals fed with HFD showed decreased performance in a running distance test, decreased citrate synthase and cathepsin L enzymatic activities, and decreased levels in markers of protein synthesis, such as Akt when compared with the group fed a standard diet (SD). There were no changes in S6k, 4EBP1, MuRF1, MAFbx and Proteasome $\beta 5$ in obese mice compared with mice fed SD, suggesting that protein synthesis was not affected in the gastrocnemius muscle. The treatment with PUFA and AET alone were able to attenuate parameters like weight gain, fat content and glucose levels. However, only AET restored insulin levels, decreasing the resistance to insulin. Furthermore, AET improved performance (distance run), increased citrate synthase enzyme and PGC1 α expression, independent of the PUFA supplementation, suggesting an increase in oxidative metabolism. In conclusion, AET promotes a protective effect on obesity and IR and contributes to maintenance of homeostasis in gastrocnemius muscle in obese mice, independently of supplementation with Ag-PUFA.

Keywords: Obesity. Skeletal muscle. Exercise. Insulin resistance. Protein synthesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: ácidos graxos

AG-W3: óleo de peixe

Akt: proteína quinase B

AMPK: *adenosine monophosphate- activated protein kinase*

ANOVA: análise de variância

AST: área de secção transversa

BiP: *binding of immunoglobulin protein*

CHOP: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*

DAG: diacilglicerol

DB: dieta balanceada

DB: dieta balanceada mais suplementação do óleo de peixe

DB+TA: dieta balanceada mais o treinamento físico aeróbico

DB+TA+W3: dieta balanceada mais o treinamento físico aeróbico mais a suplementação com o óleo de peixe

DCVs: doenças cardiovasculares

DEPTOR: *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DHA: ácido docosa-hexaenoico

DHL: dieta hiperlipídica

DHL+W3: dieta hiperlipídica mais suplementação do óleo de peixe

DHL+TA: dieta hiperlipídica mais o treinamento físico aeróbico

DHL+TA+W3: dieta hiperlipídica mais o treinamento físico aeróbico mais a suplementação com o óleo de peixe

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

EPA: ácido eicosapentaenoico

ER: estresse de retículo

ERE: estresse de retículo endoplasmático

g: grama

GLUT4: transportador de glicose 4

GSk3 β : *glycogen synthase kinase 3 beta*

HAS: hipertensão arterial

HOMA-IR: *homeostatic model assessment – insulin resistance*

iL1: interleucina 1

iL6: interleucina 6

Kg: quilogramas

LIM: lipídios intramiocelulares

NF κ B: fator nuclear kappa B

MAFbx: *muscle atrophy f-box*

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*

ME: músculo esquelético

mLST8/G β : *Mammalian lethal with SEC13 protein 8*

mSIN1: *mammalian lethal with SEC13 protein 8*

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

mTORC1: *mechanistic target of rapamycin complex 1*

MuRF1: *mmuscle ringer finger 1*

NF- κ B: fator de transcrição nuclear κ B

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDI: *protein disulfide isomerase*

PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*

PRAS40: *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*

PUFAs: ácidos graxos poliinsaturados

4EBP1: *phosphorylation of 4E-binding protein-1*

RA: resistência anabólica

RI: Resistência à Insulina

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

S6k: *70 kDa S6 kinase 1*

SUP: sistema ubiquitina proteassoma dependente de ATP

TAG: triacilglicerol

TCA: ácido tricloroacético

TNF- α : *tumor necrosis factor α*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama esquemático ilustrando as vias de sinalização envolvidas na síntese e degradação proteica no músculo esquelético	26
Figura 2 - Principais fatores que levam ao quadro de resistência anabólica no músculo esquelético funcional.....	27
Figura 3 - Massa do músculo plantar dos camundongos submetidos ao protocolo de sobrecarga	28
Figura 4 - Principais sistemas de degradação proteica no músculo esquelético	31
Figura 5 - Possíveis vias ativadas em modelos de câncer, sepse e caquexia e os benefícios associados a suplementação com EPA.....	35
Figura 6 - Procedimentos para confecção dos cortes histológicos.....	45
Figura 7 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o ganho de peso corporal de camundongos C57Bl/6J.....	50
Figura 8 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura epididimal de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	52
Figura 9 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura retroperitoneal de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	53
Figura 10 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura mesentérica de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	55
Figura 11 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o índice de adiposidade de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	56

Figura 12 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a glicemia de jejum de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	57
Figura 13 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre as concentrações plasmáticas de insulina de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	58
Figura 14 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o índice HOMA-IR de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	60
Figura 15 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do músculo gastrocnêmio de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	62
Figura 16 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	63
Figura 17 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a distância total percorrida de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	64
Figura 18 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade da enzima citrate sintase de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.	65
Figura 19 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a	

expressão proteica da PGC1 α de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	67
Figura 20 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína Akt de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	68
Figura 21 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína S6k de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	69
Figura 22 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína GSk3 β de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	70
Figura 23 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína 4EBP1 de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	71
Figura 24 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína MuRF1 de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	72
Figura 25 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína MAFbx de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	73
Figura 26 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade do proteassoma na porção β 5 de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	74

Figura 27 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade da catepsina L de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	75
Figura 28 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína BiP de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	76
Figura 29 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína PDI de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	77
Figura 30 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína CHOP de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas balanceada e hiperlipídica.....	42
Tabela 2 - Estão demonstradas as médias e desvios padrões dos resultados do ganho de peso após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos à dieta balanceada (DB) ou à dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou à suplementação com o óleo de peixe (W3).....	50
Tabela 3 – Estão demonstradas as médias e desvios padrões do peso da gordura epididimal após 12^a semanas de protocolo experimental, nos camundongos submetidos tratados com dieta balanceada (DB) ou dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou à suplementação com o óleo de peixe (W3).....	51
Tabela 4 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso da gordura retroperitoneal após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	53
Tabela 5 – Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso da gordura mesentérica após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	54
Tabela 6 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do índice de adiposidade após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	56
Tabela 7 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da glicemia de jejum após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	57
Tabela 8 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da insulina plasmática após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	58
Tabela 9 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do índice HOMA-IR após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....	60
Tabela 10 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso do músculo gastrocnêmio após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta	

balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....61

Tabela 11 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da área da secção transversa da fibra muscular distância total percorrida (m) após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....62

Tabela 12 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da distância total percorrida (m) após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....64

Tabela 13 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da enzima citrato sintase após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....65

Tabela 14 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da expressão da proteína PGC1 α após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).....66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Prevalência da Obesidade	23
1.2 Obesidade, resistência anabólica e metabolismo de proteínas	23
1.3 Sistema de degradação de proteínas e músculo esquelético	29
1.4 Papel das E3 ligases MuRF1 e MAFbx no processo de degradação muscular esquelética	31
1.5 Ácidos graxos ômega 3, obesidade e músculo esquelético	32
1.6 Treinamento físico aeróbico, obesidade, resistência à insulina e músculo esquelético	35
2 OBJETIVOS	38
3 JUSTIFICATIVA	39
4 ESTRATEGIAS EXPERIMENTAIS	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Animais	41
5.2 Procedimentos Experimentais	41
5.2.1 Indução da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica	41
5.2.2 Desenho experimental dos grupos estudados	42
5.2.2.1 <i>Objetivos dos grupos estudados</i>	43
5.2.3 Suplementação com o óleo de peixe	43
5.2.4 Teste de tolerância ao esforço	43
5.2.4.1 <i>Protocolo de treinamento físico aeróbico</i>	44
5.2.5 Avaliação da obesidade	44
5.2.6 Glicemia, insulina plasmática e índice HOMA-IR	44
5.2.7 Histologia	45
5.2.8 Expressão proteica (<i>Western Blotting</i>)	46
5.2.9 Atividade da Catepsina L	46
5.2.10 Atividade do Proteassoma na porção $\beta 5$	47
5.2.11 Atividade da Citrato Sintase	47
5.2.12 Análise Estatística	48
6 RESULTADOS	49

6.1 Parte I – Efeitos da obesidade induzida por dieta nos camundongos submetidos ou não ao protocolo de treinamento físico aeróbico e a suplementação com o óleo de peixe.....	49
6.1.1 Ganho de peso, composição corporal, índice de adiposidade, glicemia, insulinemia e índice HOMA-IR.....	49
6.2 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre o peso e área de secção transversa do músculo gastrocnêmio.....	61
6.2.1 Peso e área de secção transversa do músculo esquelético.....	61
6.3 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre a distância total percorrida, citrato sintase e expressão da proteína PGC1α no músculo gastrocnêmio.....	63
6.3.1 Distância total percorrida.....	63
6.3.2 Atividade da enzima citrato sintase.....	64
6.3.3 Expressão da proteína PGC1 α no músculo gastrocnêmio.....	66
6.4 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas da via de síntese proteica no no músculo gastrocnêmio.....	67
6.4.1 Expressão da proteína Akt fosforilada e total (razão).....	67
6.4.2 Expressão da proteína S6k fosforilada e total (razão).....	69
6.4.3 Expressão da proteína GSk3 β fosforilada e total (razão).....	70
6.4.4 Expressão da proteína 4EBP1 fosforilada e total (razão).....	71
6.5 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas da via de degradação proteica no músculo gastrocnêmio.....	72
6.5.1 Expressão das proteínas MuRF1 e MAFbx.....	72
6.5.2 Atividade do sistema ubiquitina proteassoma na porção β 5 e catepsina L.....	74
6.6 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas de estresse de retículo endoplasmático no músculo gastrocnêmio.....	76
6.6.1 Expressão das proteínas BiP, PDI e CHOP.....	76

7 DISCUSSÃO.....	79
8 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO – Relatório da Professora Sue C. Bodine sobre o estágio sanduíche do aluno Luís Gustavo Oliveira de Sousa.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prevalência da obesidade

Nos últimos 20 anos, a obesidade tem se tornado um dos principais problemas de saúde mundial, principalmente nos países ocidentais (SISHI et al., 2011). Dados da organização mundial da saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015) (WHO, 2015) demonstram que em 2014 existiam 1,9 bilhões de pessoas com sobrepeso e 600 milhões de pessoas tinham obesidade. Além disso, 39% da população maior de 18 anos tinha sobrepeso e 13% eram consideradas obesas. Somente nos Estados Unidos, onde um terço dos adultos e 17% dos jovens são obesos, os custos com o tratamento da obesidade somam \$147 bilhões de dólares por ano, totalizando 9% no total de gastos com a saúde (FINKELSTEIN et al., 2010; OGDEN et al., 2014). No Brasil, dados do ministério da saúde apontam que, pela primeira vez, mais da metade dos brasileiros estão com sobrepeso (52,5%) e 17% da população é obesa (VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO) (VIGTEL, 2014). O sobrepeso e obesidade aumentam a incidência de várias doenças, aumentando a taxa de morbidade e mortalidade gerando um custo mensal de 500 a 1.000 reais por paciente, gerando um grande custo com saúde para o governo.

1.2 Obesidade, resistência anabólica e metabolismo de proteínas

A obesidade predispõe o indivíduo a diversas condições patológicas, incluindo o *diabetes mellitus* tipo 2 DMT2, doenças cardiovasculares (DCVs), resistência à insulina (RI), hipertensão (HAS), síndrome metabólica e alguns tipos de câncer (SILVEIRA et al., 2008; SITNICK et al., 2009). Recentemente, a obesidade foi associada com o aumento na incidência de problemas relacionados ao músculo esquelético, com a redução da mobilidade e na força muscular (FALK et al., 2002). Apesar de não haver atrofia muscular em adultos jovens, a obesidade está associada à redução da força relativa (força por massa muscular) (DUVIGNEAUD et al., 2008; FOGELHOLM et al., 2006), inibição do crescimento infantil e exacerbação da perda de massa

muscular induzida pelo envelhecimento, uma condição conhecida como “sarcopenia do obeso” ou “sarcobesidade” (ILICH et al., 2014; PARR et al., 2013). Dados da literatura apontam para uma associação significativa entre a duração da obesidade e a perda de força de preensão manual (STENHOLM et al.). Considerando a relação direta entre a produção de força e longevidade, assim como o problema global da obesidade, pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos da obesidade crônica na função muscular e no processo de adaptação do músculo esquelético.

O músculo esquelético é um tecido extremamente plástico que se adapta ao longo da vida frente a uma variedade de sinais que modificam o seu tamanho e função. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica afeta negativamente propriedades importantes do músculo esquelético, incluindo a deposição de glicogênio, o metabolismo oxidativo (mitocôndrias), a geração de força e a capacidade de crescimento (hipertrofia) (HIRABARA et al., 2010; JORGENSEN et al., 2015; SITNICK et al., 2009). Considerando que o músculo esquelético é o principal órgão envolvido na captação e utilização de glicose e ácidos graxos, bem como na locomoção, é de grande importância entender como a dieta hiperlipídica afeta a capacidade do músculo esquelético de manter a geração de força e de responder adequadamente a estímulos externos de crescimento. Uma menor capacidade de hipertrofia frente a uma carga mecânica tem significado clínico importante, uma vez que a perda de massa muscular e a redução de força afetam a mobilidade. Além disso, a força e a massa muscular são inversamente associadas com aumento de mortalidade por causas diversas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer (RUIZ et al., 2008).

A obesidade crônica pode reduzir a capacidade de recuperação da força e massa muscular após um evento que induz atrofia muscular (como internação por um longo período após lesão ou doença) ou manutenção da geração de força durante o processo de envelhecimento, acelerando o processo de sarcopenia. Por exemplo, a capacidade reduzida de recuperação do músculo esquelético após a fratura de quadril aumenta a probabilidade de uma nova fratura de quadril e diminui a atividade voluntária (AUAIS et al., 2012), elevando o risco de desenvolvimento de trombose venosa profunda com embolia pulmonar fatal, a causa mais comum de morte por fratura de quadril.

Pacientes com obesidade severa que apresentaram diminuição da força de preensão manual possuem aumento de 1,4 vezes na taxa de mortalidade, sugerindo que a força é sim um preditor independente de mortalidade nos pacientes obesos (RANTANEN et al., 2000).

Considerando que o número de pessoas obesas está aumentando a cada ano e que esse aumento tem importantes implicações na taxa de sobrevivência (RUIZ et al., 2008; STENHOLM et al., 2008), é necessário aprofundar o entendimento sobre os efeitos da obesidade crônica na função muscular e na capacidade do músculo adulto hipertrofiar frente a sinais anabólicos.

Os processos de síntese e degradação proteica no músculo ocorrem em um processo contínuo com o intuito de manter a homeostase celular. Fatores como o estado nutricional, hormonal, neural e a mecanotransdução, determinam a velocidade com que a taxa de síntese e degradação ocorrem (**Figura 1**) (FREY et al., 2014; MARCOTTE et al., 2015). Esses dois processos celulares geram custo energético elevado para o nosso organismo. Em torno de 20-50% da taxa metabólica de repouso é direcionada para a renovação das proteínas (*turnover* proteico), com a síntese de cerca de 300 g de proteínas por dia em adultos saudáveis, sendo responsáveis por 1,5 kg de músculo (BAAR, 2006; FRANCH; PRICE, 2005; WATSON; BAAR, 2014; WELLE; NAIR, 1990). Desse modo, alterações em qualquer um desses dois processos refletem no metabolismo muscular. As vias celulares responsáveis pela regulação do tamanho celular sob condições de hipertrofia e atrofia em adultos ainda estão sendo elucidadas. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a via Akt/mTORC1 tem importante papel nessa regulação (BODINE et al., 2001; JEFFERSON; KIMBALL, 2001; MARCOTTE et al., 2015). A proteína “*Mammalian target of rapamycin (mTOR) 1*”, uma proteína quinase, é um importante ponto de convergência de sinalização por meio dos aminoácidos, fatores de crescimento, sobrecarga mecânica e balanço energético, tendo papel crítico na regulação da tradução do RNAm e crescimento celular. Dois distintos complexos da mTOR são conhecidos: o primeiro complexo, sensível a rapamicina, é responsável pelo controle celular e composto pela mTORC1 que, por sua vez, possui proteínas regulatórias associadas a mTOR (raptor), mLST8/G β , PRAS40 e DEPTOR; o segundo complexo, que não é sensível a rapamicina, é composto por DEPTOR, PROTOR, mLST8/G β e mSIN1. A importância da sinalização mediada pela mTOR no músculo esquelético foi primeiramente demonstrada por Baar e Esser, em 1999 (BAAR; ESSER, 1999). Nesse estudo, os autores reportaram forte correlação direta entre a fosforilação da mTORC1, S6K1 e hipertrofia muscular em ratos, durante um protocolo de treinamento físico de alta intensidade. Subsequentemente, Bodine et al., 2001 demonstraram que o processo de hipertrofia do músculo esquelético de adultos é criticamente regulado pela ativação da mTORC1 e suas proteínas-alvo, S6K1 e 4E-BP1. Subsequentemente, estudos que avaliaram modelos animais e humanos

graxos circulantes (AG) (ADAMS et al., 2004; SILVEIRA et al., 2008). Dentre os principais AG que se acumulam no músculo esquelético, estão o triacilglicerol (TAG), o diacilglicerol (DAG) e as ceramidas. O aumento no consumo de dietas ricas em lipídeos contribui com a elevação dos lipídios intramiocelulares (LIM). Uma das hipóteses é que esse aumento nas concentrações de AG poderia atenuar a síntese proteica no indivíduo obeso, contribuindo para o desenvolvimento da RA.

Figura 2 – Principais fatores que levam ao quadro de resistência anabólica no músculo esquelético. DHL: dieta hiperlipídica; ERO: espécies reativas de oxigênio.

Recentemente, Sitnick et al., (2009) demonstraram que a capacidade do músculo esquelético de hipertrofiar em resposta ao aumento de sobrecarga estava reduzida em camundongos selvagens obesos (**Figura 3**). Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência anabólica são pouco conhecidos, no entanto, hipotetiza-se que a resistência anabólica encontrada na obesidade está diretamente relacionada com o aumento do conteúdo intramiocelular de lipídios e estresse oxidativo. Nesse estudo, foi demonstrado que, após 14 dias

de sobrecarga funcional, os animais do grupo submetidos a DHL apresentaram redução significativa nas proteínas Akt e S6K quando comparado ao grupo que foi submetido à dieta com baixa quantidade de lipídeos. Além disso, houve redução na formação de polissomos, sugerindo que houve prejuízo no processo de tradução nos animais submetidos à DHL. Portanto, o músculo de animais submetidos à DHL por período prolongado tem capacidade reduzida de hipertrofiar frente ao protocolo de sobrecarga funcional que classicamente induz hipertrofia.

Figura 3 - Massa do músculo plantar dos camundongos submetidos ao protocolo de sobrecarga funcional. Diferenças no valor absoluto entre o grupo controle e os grupos submetidos a sobrecarga funcional (*functional overload*) de camundongos alimentados com dieta com baixo teor de gordura (LFD) e dieta hiperlipídica (DHL). #Diferença estatística entre os grupos DB e DHL ($p < 0.05$). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Sitnick, 2009.

Outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento da resistência anabólica e a inativação da mTORC1 é o estresse do retículo endoplasmático (ERE). O retículo endoplasmático (RE) é o local onde acontece o enovelamento e a síntese de proteínas. Diversas situações como o aumento na ingestão de ácidos graxos saturados, jejum e aumento na produção de proteínas secretoras promovem a quebra na homeostase do RE, tendo como consequência o acúmulo na quantidade de proteínas enoveladas (*unfolded proteins*) e mal enoveladas (*misfolded proteins*) (DELDICQUE, 2013). Corroborando com essa hipótese, Deldicque et al., (2010) demonstraram que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica durante 6 semanas apresentaram elevado ERE. Esse aumento, por sua vez, pode contribuir para o aumento na produção das proteínas mal enoveladas que estão associadas com a redução na síntese proteica, sensibilidade à insulina e aumento nos marcadores inflamatórios. O mesmo grupo também

demonstrou que o ERE promove inibição na ativação da mTORC1, contribuindo para a redução da síntese proteica em células musculares. No mesmo estudo, foi demonstrado que, mesmo em baixos níveis, o quadro de estresse de retículo, é suficiente para prevenir o aumento na ativação da mTORC1 após adição de leucina em células C2C12, demonstrando, assim, que o estresse de retículo contribui para a resistência anabólica, prevenindo a ativação da mTORC1. Essa resposta foi associada à inibição na fosforilação da proteína Akt e da proteína PRAS40. A redução na fosforilação da Akt resulta na diminuição da fosforilação da PRAS40, um inibidor alostérico da mTORC1. A hipofosforilação da PRAS40 resulta em uma continuada ligação com o raptor, prevenindo a fosforilação dos principais alvos da mTORC1 que medeiam a síntese proteica, como a S6K (WANG et al., 2007). Aumento na insulinemia pode elevar a fosforilação da Akt, mesmo em situações em que há aumento no ERE, a ativação da mTORC1, nesse caso, é atenuada, mas não perdida. Portanto, sugere-se que a ativação da mTORC1 pode ser atenuada e/ou prevenida pelo ERE como consequência da inativação da Akt, contribuindo para a hipofosforilação da PRAS40.

1.3 Sistemas de degradação de proteínas e atrofia muscular esquelética

O aumento na degradação proteica muscular está diretamente relacionado a hiperativação de três principais vias proteolíticas, são elas: o sistema lisossomal/autofagia, proteínas ativadas por cálcio (calpaínas) e o sistema ubiquitina proteassoma dependente de ATP (SUP). O sistema lisossomal é responsável pela degradação de proteínas de membranas e organelas (receptores, canais iônicos e mitocôndrias). As calpaínas são cisteína proteases dependentes de cálcio e estão localizadas nos sarcômeros (linha Z). O aumento na atividade dessas proteínas é desencadeado pelo aumento nas concentrações de cálcio, tendo como principal função a clivagem das proteínas miofibrilares, dentre as principais proteínas que funcionam como substratos para as calpaínas, inclui-se a titina, nebulina, proteína C, vinculina, dentre outras, que, quando degradadas, causam desarranjo estrutural das miofibrilas, com o intuito de disponibilizar essas proteínas para o processo de ubiquitinação, fornecendo o substrato para a ativação do SUP, já que o mesmo não tem a capacidade de degradar proteínas miofibrilares intactas (JACKMAN; KANDARIAN,

2004). Por outro lado, a atividade das calpaínas é regulada negativamente pela proteína Calpastatina (GOLL et al., 2008).

Em 1969, o grupo do pesquisador Golderbg demonstrou que o aumento na taxa de degradação proteica contribuía para a perda de massa muscular após submeter os animais aos protocolos de denervação ou tratamento com glicocorticóides (GOLDBERG, 1969). Após essa descoberta inicial, outros grupos demonstraram que a taxa de degradação proteica estava aumentada em outros modelos de estresse metabólico, como a sepse, câncer, *diabetes* e jejum, sendo que o principal responsável pelos eventos iniciais de degradação proteica era o Sistema Ubiquina Proteassoma dependente de ATP (SUP). O SUP é a principal via envolvida nos processos de atrofia do músculo esquelético, contribuindo para a clivagem de aproximadamente 80% das proteínas citosólicas, sendo ativado pelo fornecimento de substratos pelos outros sistemas proteolíticos (BODINE, 2013; HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Estudos recentes demonstram que os três principais sistemas proteolíticos parecem interagir de forma simultânea para o processo de proteólise muscular (ATTAIX et al., 2012; BODINE, 2013; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; SCHIAFFINO et al., 2013).

A principal função do SUP é selecionar, marcar e degradar as proteínas, auxiliando no controle de qualidade das proteínas mal formadas. A ativação desse sistema consiste de três passos altamente organizados e complexos (**Figura 4**). Inicialmente, a ubiquitina é ligada ao resíduo de cisteína da enzima ativadora, E1 (proteína ativadora), via seu terminal glicina, em um processo dependente de ATP. A etapa seguinte ocorre pela transferência da ubiquitina ativada para a enzima E2 (proteína carreadora), que tem o papel de conjugar as ubiquitinas, formando a cauda de poliubiquitina. Finalmente, a enzima E3 (ubiquitina ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína-alvo (marcação), sendo que as proteínas marcadas são reconhecidas pelo complexo proteasomal 26S (porção regulatória e catalítica), iniciando o processo de proteólise, clivando-as em pequenos polipeptídios (8-12 aminoácidos) (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; WING, 2005). Em condições patológicas, o SUP é o principal sistema envolvido na degradação das proteínas sarcoméricas em resposta à mudança na atividade contrátil (GLASS, 2010; SCHIAFFINO et al., 2013).

Figura 4 - Principais sistemas de degradação proteica no músculo esquelético. Sistema ativado pelo aumento nas concentrações de cálcio intracelular (Calpaínas) que têm a função de clivar as proteínas sarcoméricas (A), Sistema de autofagia/lisossomal (B) e Sistema Ubiquitina proteossoma dependente de ATP (C). Fonte: Jackman e Kandarian, 2004 (Revisão).

1.4 Papel das E3 ligases MuRF1 e MAFbx no processo de atrofia muscular esquelética

Após essas descobertas iniciais, dois grupos independentes identificaram duas novas E3 ubiquitinas ligases que medeiam os eventos de atrofia muscular (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Essas duas proteínas são conhecidas como *muscle RING finger 1* (MuRF1) e *Muscle atrophy F-Box* (MAFbx)/atroginal. Diversas funções do MuRF1 e MAFbx no músculo esquelético ainda estão sob intensa investigação, no entanto, já está bem estabelecido que essas duas proteínas estão envolvidas na ligação dos substratos seletivos para o processo de ubiquitinação e subsequente degradação pelo SUP. Assim, o aumento na expressão de MuRF1 e MAFbx em modelos que induzem atrofia muscular é possivelmente o principal responsável pela mudança do balanço proteico positivo para o balanço proteico negativo, contribuindo para a perda de massa muscular (BODINE, 2013).

Desde as primeiras descobertas, ficou demonstrado que a expressão de RNA mensageiro do MuRF1 e MAFbx está aumentada em diversos modelos experimentais que induzem atrofia e,

desde então, os dois genes são utilizados como marcadores-chave do processo de atrofia com algumas características fundamentais:

- a) Ambos os genes são seletivamente expressos no músculo esquelético;
- b) Ambos os genes são expressos em níveis baixos em condições de repouso, aumentando rapidamente sob condições de estresse que induzem a perda de massa muscular (atrofia).

Os domínios *RING finger E3s*, dos quais existem mais de 600 conhecidas no genoma humano, regulam a adição da ubiquitina (mono-ubiquitinação, multi-mono-ubiquitinação e multi-poli-ubiquitinação) a proteínas específicas, orientando, assim, grande variedade de destinos e funções, incluindo: degradação pelo proteassoma 26S, modificação da localização na célula, modificação das interações de proteínas, regulação da atividade de transcrição e propagação de sinalização transmembranar. Modificações na homeostase do sistema de controle de proteínas ubiquitinadas pode afetar grande variedade de funções fisiológicas e têm sido associadas ao envelhecimento, bem como, neurodegeneração e distrofia muscular (BODINE, 2013). Diversos estudos têm demonstrado que aumentos na atividade do SUP contribuem para a perda acelerada de massa muscular em diversas condições patológicas. (ATTAIX et al., 2012; BODINE et al., 2001; SCHWARTZ; CIECHANOVER, 2009).

1.5 Ácido graxo ômega 3, obesidade e músculo esquelético

Os ácidos graxos (AG) são ácidos monocarboxílicos, geralmente com uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono. A presença ou não de duplas ligações na cadeia carbônica classifica os AG em saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. As principais insaturações desses AG estão na terceira (ω -3), sexta posição (ω -6), sétima (ω -7) ou na nona posição (ω -9), a partir do hidrocarboneto final (grupo metila). Os AG poliinsaturados ω -3, encontrados em óleo de peixe, possuem efeitos anti-inflamatórios já bem estabelecidos, especialmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA; C20:5) e o docosahexaenóico (DHA; C22:6), que são precursores de eicosanóides e prostaglandinas específicos. As células animais podem apenas converter o ácido α -linolênico em outros ácidos da mesma série

AG ω -3, como o eicosapentaenóico e o docosa-hexaenóico, mas essa conversão é relativamente muito baixa em mamíferos, incluindo os humanos, sendo que a principal fonte desses AG é proveniente da dieta ou suplementação (DUTT et al., 2015; PHILLIPS, 2015).

Os AG-W3 (EPA e do DHA) possuem efeito anti-adipogênico, provavelmente, por alterar a função metabólica das mitocôndrias dos adipócitos, incluindo aumento na eficiência da beta-oxidação e da biogênese mitocondrial. No mesmo sentido, outro estudo demonstrou que, provavelmente, o EPA modula o metabolismo de lipídeos através da estimulação da lipólise, associada ao aumento na expressão de genes lipolíticos e supressão da expressão de genes adipogênicos em células 3T3-L1 (LEE et al., 2008). Além disso, os AG-W3 têm sido relacionados com melhora na sensibilidade à insulina por reduzir a ativação das citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a interleucina-1 e -6, além de diminuir o estresse oxidativo e inibir as vias de degradação de proteínas (STORLIEN et al., 1997; WHITEHOUSE et al., 2001; WHITEHOUSE; TISDALE, 2001).

Diversas intervenções nutricionais têm sido propostas para a prevenção e o tratamento da obesidade, RI e o *diabetes mellitus*. Dentre essas intervenções, os AG-W3 têm demonstrado diversos efeitos benéficos com respeito ao aumento na ativação das vias de síntese protéica (Akt, mTOR, S6k1), contribuindo para a maior taxa de síntese proteica. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que o AG-W3 também é capaz de reduzir o catabolismo proteico, diminuindo a atividade do SUP, contribuindo, dessa maneira, para a manutenção da massa muscular esquelética (STORLIEN et al., 1997; WHITEHOUSE et al., 2001; WHITEHOUSE; TISDALE, 2001; YOU et al., 2010).

Apesar da pouca quantidade de estudos avaliando o possível efeito benéfico da suplementação com AG-W3, alguns grupos têm demonstrado possível efeito positivo no músculo esquelético. Estudos realizados com modelos animais e humanos com caquexia, demonstraram que o EPA promove importante redução na degradação proteica, prevenindo a perda de massa muscular devido à redução de alguns genes relacionados com a ativação do SUP. No entanto, a suplementação com EPA não foi eficiente em aumentar a massa magra, como demonstrado pela ausência do efeito na síntese proteica (BECK et al., 1991; WHITEHOUSE et al., 2001).

Essa redução no processo de degradação de proteínas foi associada a diminuição do processo inflamatório, com inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a

interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O fator nuclear kappa beta (NF κ B) desempenha papel importante no processo de degradação proteica em modelos de câncer, sepsi e caquexia. Esse processo é mediado pelo aumento da atividade da I κ B quinase. Por outro lado, o óleo de peixe promove redução na atividade dessa quinase. Como resultado final, há redução da translocação do NF κ B do citosol para o núcleo da célula, o qual previne a ativação das enzimas E3 ligase MuRF1, inibindo a ativação do sistema ubiquitina proteassoma dependente de ATP (**Figura 5**) (DUTT et al., 2015).

Na obesidade, onde geralmente é observado o quadro de inflamação crônica, a suplementação de AG-W3 pode ser benéfica por reduzir o grau de inflamação, prevenindo a possível aceleração do processo de sarcopenia em indivíduos obesos idosos (PHILLIPS, 2015). Porém, ainda não está bem estabelecido quais são os mecanismos envolvidos na redução do proteólise e aumento da síntese proteica após a suplementação com o óleo de peixe. Portanto, mais estudos são necessários para determinar como a utilização desses metabólitos pode influenciar na melhora do metabolismo de proteínas e função muscular, investigando os possíveis mecanismos que são ativados nesse processo (DUTT et al., 2015; PHILLIPS, 2015).

Figura 5 – Possíveis vias ativadas em modelos de câncer, sepse e caquexia e os benefícios associados a suplementação com EPA. Fonte: Dutt, 2015 (Revisão).

1.6 Treinamento físico aeróbico, obesidade, resistência à insulina e músculo esquelético

A incidência da obesidade na população mundial vem crescendo a cada ano e dentre os vários fatores que estão relacionados a esse aumento, estão os níveis elevados de sedentarismo. O baixo nível de atividade física está diretamente relacionado ao desenvolvimento de várias doenças e fatores de risco, tais como resistência à insulina (RI), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial (HAS) e doenças cardiovasculares (DCVs) (DEFRONZO; ABDUL-GHANI, 2011; DONNELLY et al., 2009; HIRABARA et al., 2010).

O treinamento físico aeróbico é reconhecidamente uma ferramenta importante para a prevenção e tratamento de diversos estados patológicos, como a obesidade, DM2 e HAS, assim como na manutenção da saúde. Essa melhora está relacionada ao aumento no transporte e utilização do oxigênio pelo músculo esquelético, além da alteração na utilização do substrato energético (oxidação preferencial de lipídeos ao invés da glicose e glicogênio), aumento da densidade e número de mitocôndrias, consequentemente levando a maior capacidade de realizar

exercícios (COFFEY; HAWLEY, 2007; DONNELLY et al., 2009; RICHTER; HARGREAVES, 2013; ZURLO et al., 1990).

Dentre os vários efeitos benéficos da prática regular do exercício físico na obesidade e resistência à insulina, podemos citar, a melhora na captação de glicose e sensibilidade à insulina, aumento no transporte e oxidação de lipídeos, aumento do consumo de oxigênio, melhora da tolerância ao esforço e da qualidade de vida (RICHTER; HARGREAVES, 2013; STENHOLM et al., 2008). O músculo esquelético (ME) compõe aproximadamente 40% da massa corporal total de um indivíduo adulto saudável. Além disso, o ME é extremamente importante para manter a homeostase, sendo responsável por aproximadamente 30% da taxa metabólica de repouso (ZURLO et al., 1990).

Em adição, o ME é fundamental para o controle da glicemia plasmática, sendo responsável por até 80% da captação de glicose plasmática (DEFRONZO; ABDUL-GHANI, 2011; HAWLEY et al., 2014; NIELSEN; RICHTER, 2003). Desse modo, qualquer quebra na homeostase muscular irá afetar diretamente a captação de glicose, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e DM2, assim como, prejudicando a função muscular. Os mecanismos responsáveis pelo aumento da captação de glicose após uma sessão de exercício físico ainda não estão bem elucidados. No entanto, sabe-se que o processo de contração muscular (mecanotransdução), desencadeado pelo exercício físico, estimula a captação de glicose independente de insulina, por estimular diretamente a translocação e ativação do transportador de glicose 4 (GLUT4) do citosol para a membrana celular (RICHTER; HARGREAVES, 2013; STANFORD; GOODYEAR, 2014).

De fato, várias sessões de treinamento físico aeróbico estão relacionadas com um aumento transitório na transcrição do RNAm de várias proteínas relacionadas com a melhora do desempenho aeróbico (Hawley – 2014). Esse aumento transitório no conteúdo de RNAm, que é estimulado a cada sessão de treino, gera, cronicamente, adaptações intracelulares relacionadas à melhora da capacidade aeróbica (HAWLEY et al., 2014).

Como já mencionado, o treinamento físico aeróbico é um dos principais estímulos mecânicos para a regulação da massa muscular esquelética, por estimular as vias de síntese proteica (BAAR, 2014; COFFEY; HAWLEY, 2007), por melhorar a atividade de enzimas-chave no metabolismo oxidativo e glicolítico (HAWLEY et al., 2014) e a captação de glicose e por

aumentar o gasto energético, contribuindo para a redução do peso corporal (RICHTER; HARGREAVES, 2013; SPRIET, 2014). Assim é do interesse desse estudo investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico nas vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético (gastrocnêmio) de animais obesos e suplementados com o óleo de peixe.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no desenvolvimento da resistência à insulina e suas possíveis alterações nas vias de síntese e degradação proteica no músculo gastrocnêmio de camundongos obesos C57BL6/J, submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico e/ou suplementação com óleo de peixe rico em AG-W3.

3 JUSTIFICATIVA

A obesidade e resistência á insulina, pode levar à redução no processo de síntese proteica, conhecido como resistência anabólica, que tem consequência direta na massa muscular, afetando a produção de força, a qual tem sido demonstrada estar diretamente relacionada com a longevidade. Assim, considerando esses efeitos e que o número de pessoas obesas vem aumentando a cada ano, é importante desenvolver estratégias que ajudem a prevenir e tratar a obesidade, melhorando a qualidade de vida do indivíduo e reduzindo gastos com a saúde. Nesse sentido, é importante investigar os possíveis efeitos benéficos do treinamento físico aeróbico, associados ou não com a suplementação de óleo de peixe, nessa população.

4 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas as seguintes estratégias experimentais:

1) Os efeitos da dieta hiperlipídica no desenvolvimento da obesidade foram investigados pela avaliação do aumento dos depósitos de gordura, glicemia basal, sensibilidade à insulina e vias relacionadas a síntese e degradação proteica no músculo esquelético em camundongos C57Bl/6J;

2) Para determinação dos efeitos do treinamento físico aeróbio, os animais foram treinados por 12 semanas. Foi investigado se o treinamento tem algum efeito preventivo ou protetor no processo de ganho de peso, desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de animais submetidos à DHL;

3) Para avaliação dos efeitos da suplementação com óleo de peixe, os animais foram suplementados por 12 semanas. Foi investigado se a suplementação tem algum efeito preventivo ou protetor no processo de ganho de peso, desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de animais submetidos à DHL;

4) Os efeitos do treinamento físico aeróbio associados à suplementação com óleo de peixe também foram investigados. Os animais foram treinados e suplementados por 12 semanas. Foi estudado se essa associação tem efeito aditivo na prevenção ou proteção do processo de ganho de peso, desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de animais submetidos à DHL.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J, com idade inicial 8 semanas, provenientes do Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Todos os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo número 032/10).

5.2 Procedimentos experimentais

5.2.1 Indução da obesidade pela dieta hiperlipídica (DHL)

Inicialmente, um grupo de camundongos receberam a dieta balanceada (DB) (76% de carboidratos, 9% de gordura e 15% de proteínas; Tabela 1), durante 4 semanas (da 1^a a 4^a semana). Ao completar 4 semanas, uma parte desses camundongos continuou a receber a dieta balanceada e outra parte recebeu dieta hiperlipídica (DHL) (26% de carboidratos, 59% de gordura e 15% de proteínas, Tabela 1), durante 8 semanas (da 5^a até a 12^a semanas). Os camundongos tiveram acesso livre as duas dietas e água.

Tabela 1 - Composição das dietas balanceada e hiperlipídica

Composição	DB	DHL
	g/Kg	
Amido	465,7	115,5
Caseína	140	200
Amido dextrinizado	155	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	4	35
Banha suína	36	315
Fibra	50	50
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
L-cistina	1,8	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5

5.2.2 Desenho experimental dos grupos estudados

O desenho experimental está descrito abaixo, com o detalhamento dos grupos que foram estudados. Os camundongos C57BL6/J foram divididos em 8 grupos experimentais:

- 1) Dieta balanceada (DB)
- 2) Dieta balanceada + óleo de peixe (DB+W3)
- 3) Dieta balanceada + treinamento aeróbico (DB+TA)
- 4) Dieta balanceada + treinamento aeróbico + óleo de peixe (DB+TA+W3)
- 5) Dieta hiperlipídica (DHL)
- 6) Dieta hiperlipídica + óleo de peixe (DHL+W3)
- 7) Dieta hiperlipídica + treinamento aeróbico (DHL+TA)
- 8) Dieta hiperlipídica + treinamento aeróbico + óleo de peixe (DHL+TA+W3)

5.2.2.1 Objetivos dos grupos estudados

- **DB e DHL Controle:** Utilizados como controles em relação aos animais submetidos ao protocolo de suplementação com o óleo de peixe e/ou treinamento físico aeróbico.
- **DB e DHL + óleo de peixe:** Necessários para avaliar o efeito da suplementação com o óleo de peixe nos camundongos submetidos ou não à dieta hiperlipídica.
- **DB e DHL + treinamento aeróbico:** Requeridos para avaliar as alterações metabólicas, o “turnover” de proteínas durante as 12 semanas de tratamento com a DHL ou a DB.
- **DB e DHL + óleo de peixe + treinamento aeróbico:** Usados para avaliar um possível efeito de interação do óleo de peixe mais o treinamento sobre os parâmetros metabólicos nos camundongos submetidos ou não a dieta hiperlipídica.

5.2.3 Suplementação com o óleo de peixe

Uma parte dos animais submetidos à DB e à DHL recebeu, por meio de gavagem, a suplementação com o óleo de peixe (AG-W3) (EPA/DHA 3,7:1, proporção determinada através de análise cromatográfica; dados não mostrados), na dose de 2 g/kg, 3 vezes por semana, durante todo o procedimento experimental (da 1^a até a 12^a semana). Os animais controles (animais não suplementados) receberam água por gavagem durante todo o protocolo experimental para mimetizar a mesma condição de estresse (Figura 1). Após a quarta semana de protocolo experimental, os animais foram subdivididos em 8 grupos experimentais, que foram submetidos à DB ou à DHL por um período adicional de 8 semanas, totalizando 12 semanas de protocolo experimental.

5.2.4 Teste de tolerância ao esforço

A velocidade máxima de corrida em esteira rolante, foi estimada pela distância total percorrida durante o teste incremental máximo. Sucintamente, os animais foram adaptados a esteira rolante (10 m/min/dia), durante 5 dias com inclinação de 20°. O teste máximo teve início com velocidade de 6 m/min e a cada 3 min houve incremento na velocidade de 3 m/min (6-33

m/min) até a exaustão completa do animal. A exaustão foi determinada quando o animal não conseguiu manter o padrão de movimento na esteira.

5.2.4.1 Protocolo de treinamento físico aeróbico

Os camundongos iniciaram o protocolo de treinamento físico aeróbico com idade inicial de 8 semanas. O treinamento foi realizado em esteira rolante durante 12 semanas, com sessões de exercício de 60 min, cinco vezes por semana à 50% da velocidade máxima, atingida no teste de tolerância ao esforço, e inclinação de 20°.

5.2.5 Avaliação da obesidade

O peso corporal foi avaliado e registrado semanalmente em todos os animais. Após 48 h da última sessão de treinamento aeróbico o animal foi anestesiado com isofluorano e o sangue foi coletado via punção cardíaca após 6 horas de jejum e estocado no *freezer* -80° para avaliação da glicose e insulina plasmática.

5.2.6 Glicose, insulina plasmática e índice HOMA-IR

Após jejum de 6 horas para o teste de tolerância à glicose descrito abaixo, foi coletada a amostra capilar caudal e diluída em ácido tricloroacético (TCA) para dosagem da glicemia por *kit* colorimétrico específico (*Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais*) e em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) para determinação da insulina por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), seguindo as instruções do fabricante (*BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA*). Com os valores obtidos no teste de glicemia e insulinemia foi calculado o índice HOMA-IR (do inglês *Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance*) (MATTHEWS et al., 1985), que determina a resistência à insulina:

$$HOMA-IR = \text{glicemia (mmol/L)} \times \text{insulinemia (mU/L)} / 22,5$$

5.2.7 Histologia

Cortes seriados de 10 μm foram obtidos do músculo gastrocnêmio utilizando um criostato Leica CM 3050S (Leica Microsystems). Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina para análise da morfologia geral e área de secção transversa (AST). A captura das imagens foi realizada com magnificação objetiva de 10 vezes para determinar a área das fibras dos músculos. As imagens foram armazenadas em um computador acoplado a um sistema de vídeo por um programa de análise de imagens (*Axio Vision Software - Zeiss*). A AST (μm^2) foi determinada pela medida da área de circunferência de ≥ 200 fibras por animal, de múltiplas regiões do músculo (**Figura 6**).

Figura 6 – Procedimentos para confecção dos cortes histológicos. Remoção e congelamento do gastrocnêmio (Figuras A, B e C). Realização dos cortes e realização da técnica da hematoxilina-eosina (HE) (Figuras D, E e F).

5.2.8 Expressão proteica (*Western blotting*)

Os músculos gastrocnêmios dos animais DB e DHL submetidos à suplementação e/ou ao treinamento físico aeróbico foram homogeneizados em tampão de lise do proteasoma (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM, pH 7,5) (GOMES et al., 2012). O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 12,000 g, durante 30 min e as concentrações de proteínas foram determinadas em triplicata, usando o método Bradford (Bio-Rad). De dez a vinte microgramas de proteína foi adicionada em géis de acrilamida (SDS-PAGE) de 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado ou BSA a 3%, em solução salina Tris-tamponada com a adição de 0,1% de Tween-20 (TBST), durante 1 h e depois incubadas com o anticorpo primário durante a noite (*overnight*) a 4°C. Os anticorpos para Ser473 fosfo-Akt, (1:1000 diluição), Akt (1:1000), Thr389 fosfo-S6K1 (1:500), S6K1 (1:500), Ser9 fosfo-GSK-3β (1:1000), Thr 37/46 fosfo-4EBP1 (1:1000), 4EBP1 (1:1000), PDI (1:1000), BiP (1:1000) e CHOP (1:1000) foram adquiridos da *Cell Signalling Technology* (Beverly, MA, USA); MuRF1 e MAFbx (1:1000) foram adquiridos da ECS (1:1000) e PGC1α (1:1000) da Abcam. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP), na diluição de 1:10.000, durante 1 h à temperatura ambiente. A solução quimioluminescente HRP (Millipore) foi então adicionada às membranas. A aquisição das imagens e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o sistema para aquisição de imagens da *Amersham (AI600-GE)* e *Image Lab 5.0 software* (Biorad).

5.2.9 Atividade da Catepsina L

A atividade da catepsina L foi avaliada como previamente descrito (GOMES et al., 2012). As amostras dos animais (20-25 µg de proteínas) foram incubadas com 200 µL do substrato em 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl e 0.5 mM DTT, pH 7.5. A liberação de 7-amino-4-metilcoumarin (AMC) foi realizada por meio do fluorímetro *Fluoroskan Ascent* (*Thermo Electron*) nos comprimentos de onda de 390 nm (excitação) e 460 nm (emissão). A intensidade de fluorescência foi avaliada a cada 15 min durante 2 h. Cada análise foi realizada na presença ou ausência do inibidor da Catepsina L (50 µM *cathepsin inhibitor IV*). A atividade da

proteína foi avaliada pelo cálculo das diferenças das amostras com ou sem inibidor (Delta). Todas as análises foram lineares e cada amostra foi analisada em triplicata.

5.2.10 Atividade do Proteassoma na porção $\beta 5$

A atividade proteassomal 26S (dependente de ATP) e 20S (independente de ATP) foi avaliada como previamente descrito (GOMES et al., 2012). Brevemente, o proteassoma foi coletado do sobrenadante após 30 min de centrifugação a 12.000 g, seguido da homogeneização em 300 μ L de tampão contendo 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA e 0.5 mM DTT, pH 7,5. A atividade da porção $\beta 5$ (*Chymotrypsin like*) foi avaliada após adição de 10 μ g de proteína e do substrato fluorescente específico SUC-LLVY-AMC (Bachem). Cada análise foi realizada na presença ou ausência do inibidor do proteassoma Bortezomib, na concentração final de 2 mM. A atividade do proteassoma 20S e 26S foi avaliada pelo cálculo das diferenças das amostras com ou sem inibidor (Delta). A liberação de AMC foi realizada por meio do fluorímetro *Fluoroskan Ascent* (Thermo Electron) nos comprimentos de onda de 390 nm (excitação) e 460 nm (emissão). A intensidade de fluorescência foi avaliada a cada 15 min durante 2 h. Todas as análises foram lineares e cada amostra foi analisada em triplicata.

5.2.11 Atividade da citrato sintase (CS)

Para a determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS), utilizou-se músculo gastrocnêmio previamente armazenado a -80 °C, o qual foi homogeneizado na proporção 1:10 em tampão de extração, constituído de 50 mM Tris Base e 1 mM de EDTA, pH 7,4. Posteriormente, esse homogenato foi centrifugado a 1.300 g, por 15 min, a 4 °C. As alíquotas do sobrenadante foram separadas para dosagem de proteínas totais e para o ensaio enzimático. A atividade máxima da enzima CS foi determinada segundo o protocolo modificado de Alp *et al.* (1976) (ALP et al., 1976), a partir da quantificação do complexo amarelo formado entre a CoA liberada na reação (1) com o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) presente no tampão de ensaio, conforme equação abaixo:

Citrato Sintase

O tampão de ensaio foi constituído por Tris base a 50 mM; EDTA a 1 mM; DTNB a 0,2 mM; acetil-CoA a 0,1 mM e Triton X-100 a 1% (v/v), pH 8,1. A reação foi iniciada com a adição de oxaloacetato a 1 mM na solução de ensaio. O método baseia-se na reatividade do DTNB (reagente de Ellman) com a CoA-SH, marcando o grupo Tiol (SH), resultando em um composto iônico que absorve luz a 412 nm. Assim, a taxa de formação de CoA-SH pode ser avaliada nesse comprimento de onda. Os resultados foram expressos em nmol/min x mg de proteína-1.

5.2.12 Análise estatística

Para todos os experimentos, foi feita a comparação entre os grupos submetidos a dieta, treinamento e tratamento com o óleo de peixe utilizando a análise de variância de três vias (ANOVA de três vias). O pós-teste de *Tukey* foi utilizado para comparações múltiplas e o nível de significância foi fixado em $p \leq 0.05$.

6 RESULTADOS

Todos os resultados apresentados são em relação ao período final das 12 semanas de protocolo experimental nos animais alimentados com DB ou DHL, submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico (TA), associado ou não à suplementação com o óleo de peixe (W3). O protocolo de TA e a suplementação com o óleo de peixe foram iniciados quando os animais estavam com 8 semanas de idade (duração de 12 semanas). Já o protocolo da DHL foi iniciado nos respectivos grupos quando os animais atingiram 12 semanas de idade e permaneceu até o fim do protocolo experimental (duração de 8 semanas).

6.1 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre o ganho de peso corporal, depósitos de gordura e resistência à insulina

6.1.1 Ganho de peso, composição corporal, índice de adiposidade, glicemia e insulinemia e índice HOMA-IR

Na Tabela 2 e Figura 7A estão as médias e os desvios padrões dos resultados referentes ao ganho de peso após 12 semanas de protocolo experimental, nos camundongos submetidos à dieta balanceada (DB) ou à dieta hiperlipídica (DHL), submetidos ou não ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou suplementação com o óleo de peixe (ω -3). Ao final das 12 semanas, o grupo submetido à DHL apresentou maior ganho de peso corporal comparado ao grupo submetido à dieta balanceada ($p < 0,05$). Nos animais submetidos à dieta DHL, o protocolo de TA foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal ($p < 0,05$), porém o TA não foi capaz de normalizar o ganho de peso quando comparado ao grupo submetido à dieta balanceada (**Figura 7B**). O mesmo efeito preventivo no ganho de peso foi observado nos camundongos obesos submetidos à suplementação com o óleo de peixe (**Figura 7C**).

Tabela 2 - Estão demonstradas as médias e desvios padrões dos resultados do ganho de peso após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos à dieta balanceada (DB) ou à dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou à suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	3,58 ± 1,95	11,33 ± 2,89
TA	3,53 ± 1,56	7,49 ± 1,38
W3	3,76 ± 1,97	8,72 ± 3,27
TA+W3	3,68 ± 2,57	5,92 ± 1,45

n=10 animais por grupo

Figura 7 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos tratados com dieta balanceada ou dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso corporal de camundongos C57Bl/6J (A). Em (A), estão apresentadas as médias e os desvios padrões do ganho de peso corporal (g); ANOVA: Dieta x TA x AG-W3, $p=0,594$. Em (B), estão apresentadas as diferenças entre a massa corporal nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico; ANOVA: Dieta x TA, $p=0,002$. Em (C), estão apresentadas as diferenças entre o ganho de peso corporal nos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe; ANOVA: Dieta x AG-W3, $p=0,027$. DB-C= dieta balanceada - controle (n=10); DB+W3 = dieta balanceada suplementado com óleo de peixe (n=10); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=10); DHL+W3 = dieta hiperlipídica suplementado com óleo de peixe (n=10); DB+TA = Dieta balanceada submetido ao treinamento aeróbico (n=10); DB+TA+W3 = Dieta balanceada submetido ao treinamento aeróbico e suplementado com óleo de peixe (n=10); DHL+TA = Dieta hiperlipídica submetido ao treinamento aeróbico (n=10); DHL+TA+W3 = Dieta

hiperlipídica submetido ao treinamento aeróbico e suplementado com óleo de peixe (n=10). *p<0,05 (*Three-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*).

Ao final das 12^a semanas de protocolo experimental (**Tabela 3 e Figuras 8**), foi observado aumento significativo no peso da gordura epididimal dos camundongos submetidos à DHL, comparado com os camundongos submetidos à DB. Independente de qualquer outro fator, o óleo de peixe teve efeito preventivo no aumento do peso da gordura epididimal nos grupos submetidos à DHL ou à DB e associados ou não ao TA. O TA foi capaz de prevenir o aumento do peso da gordura epididimal somente nos animais submetidos à DHL, não tendo nenhum efeito nos animais submetidos à DB.

Tabela 3 - Estão demonstradas as médias e desvios padrões do peso da gordura epididimal após 12^a semanas de protocolo experimental, nos camundongos submetidos e tratados com dieta balanceada (DB) ou dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou à suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	0,41 ± 0,14	1,88 ± 0,55
TA	0,36 ± 0,07	0,85 ± 0,39
W3	0,40 ± 0,12	1,39 ± 0,54
TA+W3	0,33 ± 0,15	0,57 ± 0,25

n=10 animais por grupo

Figura 8 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura epididimal de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do peso da gordura epididimal (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,827$. Em (B), estão apresentadas as diferenças no peso da gordura epididimal nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. Em (C), estão apresentadas as diferenças entre o ganho de peso corporal nos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe. ANOVA: W3, $p=0,009$. DB-C= dieta balanceada ($n=10$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=10$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=10$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=10$); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=10$); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=10$); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=10$); DHL+TA+ W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=10$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Na figura 9, comportamento semelhante a gordura epididimal foi observado com relação à gordura retroperitoneal. Os animais submetidos à DHL hiperlipídica tiveram maior ganho de peso nesse depósito de gordura comparado ao grupo DB. Todos os grupos que foram submetidos ao protocolo de TA reduziram o peso da gordura retroperitoneal em comparação aos grupos não treinados, independente de qualquer outro fator. A suplementação com o óleo de peixe não foi capaz de prevenir o ganho de peso nos camundongos obesos comparado ao DB.

Tabela 4 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso da gordura retroperitoneal após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	0,21 ± 0,07	0,88 ± 0,51
TA	0,13 ± 0,06	0,45 ± 0,21
W3	0,20 ± 0,11	0,73 ± 0,28
TA+W3	0,13 ± 0,09	0,29 ± 0,20

n=10 animais por grupo

Figura 9 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura retroperitoneal de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do peso da gordura retroperitoneal (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,304$. Em (B), estão apresentadas as diferenças no peso da gordura retroperitoneal nos camundongos submetidos ao protocolo de DHL. ANOVA: Dieta, $p=0,001$. Em (C) estão apresentadas as diferenças no peso da gordura epididimal nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: TA, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada (n=10); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=10); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=10); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=10); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=10); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=10); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=10); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=10). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Os resultados do peso da gordura mesentérica estão apresentados na figura 10. Novamente, os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram peso final maior quando comparado ao grupo submetido à DB. O TA foi capaz de prevenir o ganho de peso nesse depósito nos animais submetidos à DHL quando comparados aos animais do grupo DHL sedentários, porém o TA não normalizou o peso aos níveis dos animais submetidos à DB. Em relação à suplementação com o óleo de peixe, independente de qualquer outro fator, os grupos submetidos à suplementação preveniram o aumento da gordura mesentérica quando comparados aos grupos não suplementados.

Tabela 5 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso da gordura mesentérica após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	0,43 ± 0,13	0,90 ± 0,30
TA	0,43 ± 0,07	0,61 ± 0,24
W3	0,35 ± 0,12	0,72 ± 0,22
TA+W3	0,41 ± 0,06	0,49 ± 0,08

n=10 animais por grupo

Figura 10 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do depósito de gordura mesentérica de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do peso da mesentérica (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,687$. Em (B), estão apresentadas as diferenças de peso da gordura mesentérica nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. Em (C), estão apresentadas as diferenças de peso da gordura mesentérica nos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe. ANOVA: W3, $p=0,014$. DB-C= dieta balanceada ($n=10$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=10$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=10$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=10$); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=10$); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=10$); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=10$); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=10$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

O índice de adiposidade foi maior nos animais submetidos à DHL quando comparados aos animais submetidos à DB (**Figura 11A**). O TA reduziu o aumento no índice de adiposidade quando comparado aos animais não treinados tratados com DHL (**Figura 11B**). O óleo de peixe preveniu o aumento no índice de adiposidade, independente de qualquer outro fator ou grupo (**figura 11C**). Desse modo, esses resultados são sugestivos de que tanto o óleo de peixe como o TA são capazes de prevenir o aumento no índice de adiposidade. No entanto, não houve efeito sinérgico ou aditivo quando o TA foi associado à suplementação com o óleo de peixe.

Tabela 6 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do índice de adiposidade após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	1,05 ± 0,21	3,66 ± 0,86
TA	0,91 ± 0,15	1,90 ± 0,80
W3	0,96 ± 0,19	2,84 ± 0,85
TA+W3	0,87 ± 0,27	1,35 ± 0,48

n=10 animais por grupo

Figura 11 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o índice de adiposidade de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do Índice de Adiposidade (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,825$. Em (B), estão apresentadas as diferenças no índice de adiposidade dos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. Em (C), estão apresentadas as diferenças no índice de adiposidade dos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe. ANOVA: AG-W3, $p=0,003$. DB-C= dieta balanceada (n=10); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=10); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=10); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=10); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=10); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=10); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=10); DHL+TA+ W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=10). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Os animais submetidos à DHL apresentaram aumento da glicemia de jejum comparado aos camundongos submetidos à DB (**Tabela 7 e Figuras 12**). O protocolo de TA foi capaz de normalizar os níveis glicêmicos dos animais submetidos à DHL, valores esses que ficaram próximos aos valores dos animais controles submetidos à DB (**Figura 12B**). A suplementação com o óleo de peixe foi capaz de prevenir o aumento na glicemia, independente de qualquer outro fator (**Figura 12C**).

Tabela 7 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da glicemia de jejum após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	185,37 ± 12,74	225,38 ± 26,84
TA	205,91 ± 13,51	205,22 ± 16,43
W3	173,78 ± 28,20	208,05 ± 26,12
TA+W3	184,14 ± 19,11	181,95 ± 18,91

n=10 animais por grupo

Figura 12 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a glicemia de jejum de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da glicemia basal (mg/dl). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,842$. Em (B), estão apresentadas as diferenças de glicemia nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. Em (C), estão apresentadas as diferenças de glicemia nos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe. ANOVA: W3, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada ($n=10$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=10$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=10$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=10$); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=10$); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=10$); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=10$); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=10$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Ao final da 12^a semana de protocolo experimental, houve aumento significativo nos níveis de insulina plasmáticos nos animais submetidos à DHL em relação aos animais submetidos à DB (**Tabela 8 e Figuras 13**). O TA ou a suplementação com o óleo de peixe, isoladamente, não foram eficientes em reduzir as concentrações de insulina plasmática nos animais obesos quando comparados aos animais sedentários. Por outro lado, quando os TA foram associados à suplementação com o óleo de peixe, no entanto, foi observado efeito preventivo no aumento nas concentrações plasmáticas de insulina nos animais submetidos à DHL, normalizando aos níveis de insulina para valores próximos dos animais tratados com DB (**Figura 13**). Não houve diferença significativa entre os animais tratados com DB submetidos ou não ao TA e/ou a suplementação com o óleo de peixe.

Tabela 8 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da insulina plasmática após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetidos ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	185,37 ± 12,74	225,38 ± 26,84
TA	205,91 ± 13,51	205,22 ± 16,43
W3	173,78 ± 28,20	208,05 ± 26,12
TA+W3	184,14 ± 19,11	181,95 ± 18,91

n=10 animais por grupo

Figura 13 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre as concentrações plasmáticas de insulina de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Estão apresentadas as médias e os desvios padrão da insulina (ng/ml). ANOVA, Dieta x TA x AG-W3, $p=0,047$. C = dieta balanceada (n=10); C+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=10); DHL = dieta hiperlipídica (n=10); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=10); C+W3 Dieta balanceada mais óleo de peixe (n=10); C+TA Dieta balanceada mais treinamento aeróbico; C+TA+W3 Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=10); DHL+N3 Dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=10); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe. * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

O presente protocolo experimental demonstrar que 8 semanas de tratamento com DHL foi capaz de elevar os níveis de glicemia e insulinemia basais. O grupo submetido à DHL+W3 não foi capaz de diminuir a resistência à insulina, como observado pelo índice HOMA-IR. Por outro lado, os animais submetidos ao protocolo de TA apresentaram prevenção no aumento da resistência à insulina, como observado nos animais submetidos à DHL, demonstrando que o TA promove esse efeito independentemente da suplementação com o óleo de peixe (**Tabela 8 e Figuras 14**).

Tabela 9 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do índice HOMA-IR após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	3,63 ± 0,64	9,00 ± 4,18
TA	2,91 ± 1,24	4,82 ± 2,99
W3	3,02 ± 1,25	7,85 ± 3,39
TA+W3	3,08 ± 1,28	2,86 ± 1,08

n=10 animais por grupo

Figura 14 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o índice HOMA-IR de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do índice HOMA-IR. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,154$. Em (B), está apresentada a diferença entre o índice HOMA-IR nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada (n=10); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=10); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=10); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=10); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=10); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=10); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=10); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=10). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.2 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre o peso e área de secção transversa do músculo gastrocnêmio

6.2.1 Peso e área de secção transversa do músculo gastrocnêmio

Em relação ao peso do músculo gastrocnêmio, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados após 12 semanas de protocolo experimental, demonstrando que 8 semanas de DHL não são suficientes para promover alterações no peso total do músculo. No mesmo sentido, 12^a semanas de TA, associado ou não a suplementação com o óleo de peixe, não foram capazes de alterar o peso do músculo (**Tabela 10 e Figura 15**).

Tabela 10 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados do peso do músculo gastrocnêmio após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	168,89 ± 12,30	178,17 ± 14,12
TA	173,34 ± 13,54	177,86 ± 11,26
W3	173,73 ± 9,59	176,14 ± 12,51
TA+W3	170,14 ± 13,30	170,24 ± 11,16

n=10 animais por grupo

Figura 15 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre o peso do músculo gastrocnêmio de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do peso do músculo gastrocnêmio (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,825$; Dieta x W3, $p=0,308$; Dieta x TA, $p=0,522$; Dieta, $p=0,143$; W3, $p=0,469$; TA, $p=0,629$. DB-C= dieta balanceada ($n=10$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=10$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=10$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=10$); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=10$); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=10$); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=10$); DHL+TA+ W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=10$). * $p<0,05$ (*Three-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*).

Em relação a área de secção transversa da fibra muscular, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (**Tabela 11 e Figuras 16**).

Tabela 11 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da área da secção transversa da fibra muscular distância total percorrida (m) após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	1217,38 ± 47,21	1145,78 ± 245,47
TA	1122,21 ± 196,02	1234,01 ± 67,54
W3	1224,89 ± 269,26	1189,03 ± 82,65
TA+W3	1170,89 ± 98,27	1211,31 ± 62,55

n=4 a 5 animais por grupo

Figura 16 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da área de secção transversa (AST) do músculo gastrocnêmio (μm^2). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,646$; Dieta x W3, $p=0,878$; Dieta x TA, $p=0,271$; Dieta, $p=0,848$; W3, $p=0,742$; TA, $p=0,868$. Em (B), estão apresentadas os a distribuição dos animias em cada grupo estudado. DB-C= dieta balanceada ($n=4$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=5$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=5$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=4$); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=4$); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=4$); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=4$); DHL+TA+W3 Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=10$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.3 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre a distância total percorrida, citrato sintase e expressão da proteína PGC1 α no músculo gastrocnêmio

6.3.1 Distância total percorrida

Os resultados referentes ao desempenho aeróbico e metabolismo oxidativo estão apresentados na Figura 17. Apesar de não ter sido observadas diferenças na AST e no peso do músculo gastrocnêmio, foram observadas melhoras na distância total percorrida e na atividade da enzima citrato sintase dos animais submetidos a 12 semanas de treinamento físico aeróbico.

Os animais submetidos ao protocolo de TA apresentaram aumento da distância percorrida, observado nos animais submetidos à DB e a DHL. Porém a suplementação com o óleo de peixe não apresentou esse resultado (**Figura 17 e Tabela 12**).

Tabela 12 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da distância total percorrida (m) após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta

balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	0,494 ± 0,082	0,395 ± 0,091
TA	0,818 ± 0,169	0,558 ± 0,080
W3	0,450 ± 0,093	0,382 ± 0,075
TA+W3	0,680 ± 0,120	0,657 ± 0,085

n=9-11 animais por grupo

Figura 17 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a distância total percorrida de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da distância percorrida (m). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,032$. DB-C= dieta balanceada (n=10); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=9); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=11); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=9); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=10); DB+TA+W3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=11); DHL+TA = Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=10); DHL+TA+W3 = Dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=10). * $p<0,05$ (ANOVA, Tukey).

6.3.2 Atividade da enzima citrato sintase

Outro parâmetro avaliado relacionado ao desempenho aeróbico foi a atividade da enzima citrato sintase. A citrato sintase é uma enzima-chave associada ao metabolismo oxidativo. Não foram observadas diferenças significativas nos animais submetidos à DB em relação à DHL

(Tabela 13 e Figura 18), sugerindo que os animais submetidos à DHL não têm prejuízo na atividade dessa enzima. Ao final das 12^a semanas de TA, todos os grupos submetidos ao protocolo de treinamento aumentaram a atividade da citrato sintase, independente da suplementação com o óleo de peixe ou da dieta utilizada. Esses resultados são sugestivos de que o protocolo de treinamento utilizado foi eficiente em melhorar a capacidade oxidativa do músculo gastrocnêmio (Figura 18B).

Tabela 13 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da enzima citrato sintase após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3).

	DB	DHL
C	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03
TA	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,03
W3	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,02
TA+W3	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,03

n=7-10 animais por grupo

Figura 18 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade da enzima citrato sintase de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão do enzima citrato sintase (g). ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,188$. Em (B), estão apresentadas as diferenças entre na atividade da citrato sintase nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada ($n=9$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=8$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=9$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=10$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=7$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=8$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=8$); DHL+TA+ W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=8$). * $p<0,05$ (ANOVA, Tukey).

Como podemos observar na Tabela 14 e Figuras 19A e 19B, os animais obesos apresentaram menor expressão da proteína PGC1 α , quando comparado ao grupo submetido à DB ao final do protocolo experimental, independentemente do TA e da suplementação com o óleo de peixe. Por outro lado, 12 semanas de treinamento físico aeróbico foram suficientes para aumentar a expressão da PGC1 α em todos os grupos treinados em comparação aos grupos de animais que não realizaram o treinamento aeróbico (Figura 16C). Na Figura 16D está apresentada a membrana corada com vermelho de Ponceau S, o qual foi utilizado para normalização dos resultados.

6.3.3 Expressão da proteína PGC1 α no músculo gastrocnêmio

Tabela 14 - Estão demonstradas as médias e desvio padrão dos resultados da expressão da proteína PGC1 α após 12 semanas de tratamento nos camundongos submetidos a dieta balanceada (DB) ou a dieta hiperlipídica (DHL), controle (C), submetido ao treinamento físico aeróbico (TA) e/ou a suplementação com o óleo de peixe (W3)

	DB	DHL
C	100 $\pm$ 8,89	95,41 $\pm$ 20,16
TA	195 $\pm$ 50,97	131,88 $\pm$ 21,79
W3	108 $\pm$ 25,25	77,26 $\pm$ 24,36
TA+W3	174 $\pm$ 53,61	107,31 $\pm$ 8,91

n=6 animais por grupo

Figura 19 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão proteica da PGC1 α de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da proteína PGC1 α . ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,410$. Em (B), estão apresentadas as diferenças na expressão da proteína PGC1 α nos camundongos submetidos a dieta, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+ W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.4 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas da via de síntese proteica no músculo gastrocnêmio

6.4.1 Expressão da proteína Akt fosforilada e total (razão)

Para dar início à avaliação das vias relacionadas ao processo de síntese proteica no músculo esquelético, foi determinada a expressão de algumas proteínas-chave no processo de síntese. A primeira proteína avaliada foi a Akt (**Figuras 20**). Para isso, foi mensurada a razão da

proteína fosforilada pela proteína total da Akt, para determinar a sua expressão. Nos animais sedentários submetidos à DHL, independente da suplementação com AG-W3, houve redução de 35,9% *versus* os animais submetidos à DB dos grupos sedentários, sugerindo que 8 semanas de DHL é capaz de reduzir a ativação dessa proteína nos animais obesos. Também houve redução na expressão da Akt nos animais tratados com a DB submetidos ao protocolo de treinamento físico, suplementados ou não com o AG-W3, em relação ao grupo controle tratado com a DB. Não foram observadas diferenças entre os animais submetidos à DHL em nenhum dos grupos estudados.

Figura 20 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína Akt de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da razão da proteína Akt. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,319$. Em (B), está apresentada a diferenças da razão da proteína Akt nos camundongos DB e DHL submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,016$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+ W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.4.2 Expressão da proteína S6k fosforilada e total (razão)

Também foi avaliada a proteína ribossomal S6k (P70S6k). O comportamento da proteína S6k foi semelhante aos resultados encontrados com a Akt. Nos animais treinados, submetidos à DB, houve redução de 45,2%, na expressão da S6k, independente da suplementação com óleo de peixe, quando comparado com os animais do grupo DB sedentário. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos dos animais submetidos à DHL, sugerindo que 8 semanas de tratamento com DHL não foi capaz de induzir a resistência anabólica. (**Figuras 21**).

Figura 21 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína S6k de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na razão da proteína S6k. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,763$. Em (B), estão apresentadas as diferenças na razões da proteína S6k nos camundongos DB e DHL submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,006$. DB-C = dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.4.3 Expressão da proteína GSk3 β fosforilada e total (razão)

A proteína GSk3 β é inibida pela proteína Akt e, por esse motivo, também foi avaliada no presente estudo. Como observado na figura 20, não foram observadas diferenças significativas na razão da proteína fosforilada pela proteína total em nenhum dos grupos submetidos à DB. Por outro lado, nos animais submetidos à DHL, houve diferença significativa entre o grupo sedentário (DHL-C) *versus* o grupo suplementado com o óleo de peixe (DHL-W3). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos submetidos à DHL e DB, suplementados com o AG-W3 e submetidos ao TA (**Figuras 22**).

Figura 22 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína GSk3 β de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,027$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.4.4 Expressão da proteína 4EBP1 fosforilada e total (razão)

Outro possível alvo avaliado no presente projeto foi a expressão da proteína 4EBP1. A proteína 4EBP1 é ligada fisicamente ao fator de iniciação da tradução em eucariótico (eIF4E), o qual impede o processo de síntese proteica. Quando fosforilada pela proteína Akt, a proteína 4EBP1 deixa de se ligar a proteína eIF4E, liberando a mesma para dar início ao processo de síntese proteica. Não foi empregada análise estatística para esse parâmetro devido a falta de homogeneidade de variâncias.

Figura 23 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a razão fosforilada pela total da proteína 4EBP1 de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios na razão da proteína 4EBP1. DB-C= dieta balanceada (n=6); DB+ω3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=6); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=6); DHL+ω3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=6); DB+TA = Dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=6); DB+TA+ω3 = Dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=6); DHL+TA Dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=6); DHL+TA+ ω3 Dieta hiperlipidica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=6).

6.5 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas da via de degradação proteica no músculo gastrocnêmio

6.5.1 Expressão da proteína MuRF1 e MAFbx

As enzimas E3 ligases MuRF1 e MAFbx são uma classe de ubiquitina ligases determinante para o processo de degradação proteica. Para tanto, sua expressão foi avaliada no presente projeto para observar um possível efeito modulador da dieta, treino e suplementação. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados, como demonstrado na figura 24A.

Figura 24 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína MuRF1 de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na expressão da proteína MuRF1. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,797$; Dieta x TA, $p=0,579$; Dieta x W3, $p=0,648$; Dieta, $p=0,939$; TA, $p=0,513$; W3, $p=0,483$. Em (B), esta representado o Ponceau, o qual foi utilizado para normalizar a proteína. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos animais dos grupos submetidos a DHL (Figura 25).

Figura 25 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína MAFbx de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na expressão da proteína MAFbx. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,532$. Em (B), estão apresentadas as diferenças entre na expressão da proteína MAFbx nos camundongos suplementados ou não com o óleo de peixe. ANOVA: Dieta x W3, $p=0,018$. Em (C), estão apresentadas as diferenças na expressão da proteína MAFbx nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, $p=0,001$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+ W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.5.2 Atividade do Sistema ubiquitina Proteassoma na porção $\beta 5$

Avaliando a atividade do sistema ubiquitina proteassoma na porção $\beta 5$, o qual é um dos principais sistemas de degradação proteica no músculo esquelético, não foram observadas nenhuma diferença significativa em nenhum dos animais submetidos ou não a DHL (**Figura 26**).

Figura 26 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade do proteassoma na porção $\beta 5$ de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão da atividade do proteassoma na porção $\beta 5$. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,245$; Dieta x TA, $p=0,140$; Dieta x W3, $p=0,496$; Dieta, $p=0,427$; TA, $p=0,520$; W3, $p=0,545$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o sistema de autofagia contribui para as alterações músculo esqueléticas encontradas na obesidade. Outro importante sítio de degradação no músculo também foi avaliado (**Figura 27**). Para tanto, foi a atividade da catepsina L foi avaliada. Nos animais obesos sedentários, houve uma redução na atividade da catepsina L em relação aos animais DB sedentários. Porém, não foram observadas diferença nos outros grupos estudados.

Figura 27 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a atividade da catepsina L de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na atividade da catepsina L. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,058$. Em (B), está apresentada a atividade da catepsina L nos camundongos DB e DHL, ANOVA: Dieta, $p=0,012$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

6.6 Efeitos comparativos entre os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados ou não com o óleo de peixe, sobre as proteínas de estresse de retículo endoplasmático no músculo gastrocnêmio

6.6.1 Expressão das proteínas BiP, PDI e CHOP

Uma das hipóteses do presente trabalho seria que, nos grupos tratados com DHL e submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico, haveria aumento nos marcadores de estresse de retículo endoplasmático. Para investigar essa possibilidade, determinamos a expressão proteica de algumas proteínas-chave envolvidas no estresse de retículo. Uma das proteínas avaliadas foi o BiP (**Figuras 28**). Após 12 semanas de intervenção, houve redução na expressão dessa proteína no grupo treinado submetido à DHL em relação ao seu respectivo grupo controle tratado com DHL (78.51 ± 10.17) em relação ao seu respectivo grupo controle DHL (113.88 ± 20.59) e ao DB treinado (120.78 ± 18.50). Também houve diferença no grupo tratado com DHL, treinado e suplementado com o óleo de peixe (87.42 ± 10.42), em relação ao DB treinado e suplementado (123.96 ± 19.91). Os valores da presente proteína, não foram alterados em nenhum dos grupos submetidos à DB.

Figura 28 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína BiP de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na expressão da proteína BiP. ANOVA: Dieta x TA x AG-N3, $p=0,028$. Em (B), está a imagem da proteína total que foi utilizada para a normalização da proteína BiP. DB-C= dieta balanceada (n=6); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=6); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=6); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=6); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=6); DB+TA+W3 = dieta balanceada,

treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=6); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=6); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=6). *p<0,05 (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Para dar continuidade, a proteína PDI, outro marcador do estresse de retículo, foi avaliada. Seguidas as 12 semanas de protocolo experimental, a expressão da PDI foi maior nos os grupos DB submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico em relação ao seu controle DB (**Figuras 29**). A expressão da PDI não foi alterada nos grupos submetidos à DHL.

Figura 29 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína PDI de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. Em (A) estão apresentadas as médias e os desvios padrão na expressão da proteína PDI. ANOVA: Dieta x TA x AG-N3, p=0,619. Em (B), estão apresentadas as diferenças na expressão da proteína PDI nos camundongos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico. ANOVA: Dieta x TA, p=0,009. DB-C= dieta balanceada (n=6); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe (n=6); DHL-C = dieta hiperlipídica (n=6); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe (n=6); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico (n=6); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe (n=6); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico (n=6); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe (n=6). *p<0,05 (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

A última proteína avaliada relacionada ao estresse de retículo, foi a proteína CHOP. Não foram observadas diferenças significativas na expressão da CHOP em nenhum dos grupos estudados após as 12 semanas de protocolo experimental (**Figuras 30**). Na figura 30B, está a imagem representativa da membrana de nitrocelulose corada com o *Vermelho de Ponceau S*, o qual foi utilizado para a normalização dos resultados.

Figura 30 - Efeitos da suplementação com o óleo de peixe associado ou não ao treinamento físico aeróbico em camundongos submetidos a dieta balanceada e hiperlipídica sobre a expressão da proteína CHOP de camundongos C57Bl/6 ao final de 12 semanas de tratamento. CHOP. ANOVA: Dieta x TA x W3, $p=0,342$, Dieta x TA, $p=0,875$; Dieta x W3, $p=0,129$, Dieta, $p=0,087$; TA, $p=0,356$; W3, $p=0,308$. DB-C= dieta balanceada ($n=6$); DB+W3 = dieta balanceada mais óleo de peixe ($n=6$); DHL-C = dieta hiperlipídica ($n=6$); DHL+W3 = dieta hiperlipídica mais óleo de peixe ($n=6$); DB+TA = dieta balanceada mais treinamento aeróbico ($n=6$); DB+TA+W3 = dieta balanceada, treinamento aeróbico e óleo de peixe ($n=6$); DHL+TA = dieta hiperlipídica mais treinamento aeróbico ($n=6$); DHL+TA+W3 = dieta hiperlipídica, treinamento aeróbico mais óleo de peixe ($n=6$). * $p<0,05$ (Three-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

7 DISCUSSÃO

Diversos fatores estão associados com o aumento na incidência do sobrepeso e obesidade no mundo, dentre os fatores mais comuns estão o baixo nível de atividade física e o aumento no consumo de alimentos calóricos, ricos principalmente em gorduras e carboidratos (DONNELLY et al., 2009; MASI et al., 2012). As dietas hipercalóricas e hiperlipídicas têm sido utilizadas como modelos de indução de obesidade, mimetizando as condições encontradas nos humanos (CATTAPRETA et al., 2012; HARIRI; THIBAUT, 2010). No entanto, somente o aumento na ingestão de lipídeos não explica o desenvolvimento da obesidade *per se*. Alguns trabalhos têm demonstrado que a quantidade de ácidos graxos saturados presentes na dieta tem papel fundamental para o desenvolvimento da obesidade (LOVEJOY, 2002; MOUSSAVI et al., 2008). O ganho de peso corporal é resultado do aumento do consumo energético associado à redução do gasto, favorecendo o balanço energético positivo e consequente aumento do estoque de tecido adiposo (DONNELLY et al., 2009; HARIRI; THIBAUT, 2010). Nesse sentido, inúmeros trabalhos têm demonstrado correlação positiva entre o ganho de peso corporal e o aumento da quantidade de lipídeos na dieta, o qual favorece o desenvolvimento da obesidade em modelos animais e humanos (BOURGEOIS et al., 1983; HARIRI; THIBAUT, 2010; LOVEJOY, 2002). De maneira geral dietas que induzem obesidade normalmente utilizam de 38-70% da quantidade total de energia provinda dos lipídeos e carboidratos (dieta de cafeteria) (BUETTNER et al., 2007; HARIRI; THIBAUT, 2010). No presente estudo, o total de energia provinda dos lipídeos foi de 59%, sendo que 90% dos lipídeos da DHL tinha como origem a banha suína, a qual é rica em ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Outros 10% dos lipídeos eram provenientes do óleo de soja, de forma similar a outros estudos encontrados na literatura (BUETTNER et al., 2007; HARIRI; THIBAUT, 2010).

No presente protocolo experimental, demonstramos que 8 semanas de DHL foram suficientes em promover elevações no ganho de peso corporal nos animais sedentários. Esse aumento foi acompanhado pela elevação de todos os depósitos de gordura (gorduras epididimal, retroperitoneal, mesentérica) e, consequentemente, contribuiu para o aumento no índice de adiposidade, glicemia e insulinemia basais e o índice HOMA-IR, nos camundongos C57BL/6J submetidos à DHL em relação aos camundongos submetidos à DB, sugerindo que a DHL utilizada no presente estudo foi eficiente em promover resistência à insulina nos animais obesos.

Esses dados são consistentes com outros estudos que utilizaram a DHL com objetivo de induzir o ganho de peso e promover alterações nos níveis glicêmicos e de insulina (HAN et al., 1997; LIMA et al., 2014; SAMUEL et al., 2010).

Diversos estudos demonstram correlação positiva entre o aumento no consumo de ácidos graxos polinsaturados, em especial o óleo de peixe, e redução em alguns fatores de risco cardiovascular, obesidade, inflamação e resistência à insulina (DELARUE et al., 2004; HAINAULT et al., 1993; LEE et al., 2008). No presente estudo, a suplementação com o óleo de peixe (2 g/kg, 3 vezes por semana, durante 12 semanas) foi capaz de prevenir algumas alterações induzidas pela DHL, tais como: o ganho de peso corporal, depósitos de gordura, índice de adiposidade e glicemia quando comparado aos animais submetidos à DHL não suplementados. Porém, apesar de reduzir o ganho de peso corporal, os animais tratados com DHL e suplementados com AG-W3 não conseguiram reestabelecer os valores normais do peso corporal, depósitos de gorduras (epididimal, retroperitoneal e mesentérica) e índice de adiposidade em relação ao seu respectivo grupo controle (animais tratados com DB e suplementados com AG-W3). Esses dados corroboram outros estudos que utilizaram o óleo de peixe em animais submetidos à DHL (HAINAULT et al., 1993; SAMANE et al., 2009). Os possíveis mecanismos envolvidos na redução da gordura corporal com a suplementação com o ômega 3 ainda não estão completamente esclarecidos. No entanto, alguns autores sugerem que esse efeito está associado com o aumento na taxa da beta-oxidação nos animais submetidos à suplementação de AG-W3, diminuindo a síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos livres, tendo como consequência a redução da quantidade de lipídeos intramiocelular (LOMBARDO; CHICCO, 2006; SAMUEL et al., 2010). Além disso, outros trabalhos têm demonstrado que a suplementação com o AG-W3 está envolvida no aumento na expressão de genes relacionados à melhora da função enzimática e mitocondrial (LOMBARDO; CHICCO, 2006). Ainda, outros autores sugerem possível efeito na supressão do apetite, contribuindo para os efeitos benéficos na saúde observados com a suplementação com AG-W3 (PARRA et al., 2008).

Os resultados encontrados são similares aos observados em outros estudos, os quais avaliaram os efeitos da suplementação do óleo de peixe na prevenção do ganho de peso corporal (HAINAULT et al., 1993; RUZICKOVA et al., 2004). Lemieux *et al.* (2015) (LEMIEUX et al., 2015) demonstraram, em camundongos C57Bl6 que receberam DHL durante 11 semanas (45% do total de energia provinda da gordura), que essa dieta foi capaz de aumentar o peso corporal,

adiposidade, diâmetro do adipócito e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Nesse mesmo estudo, após 6 semanas de DHL, um subgrupo recebeu a DHL rica em EPA (45% do total de energia provinda da gordura + 36 g/kg de EPA, DHL+EPA), por mais 5 semanas (totalizando 11 semanas). Foi observado que a DHL rica em AG-W3 foi capaz de prevenir o ganho de peso, aumento da adiposidade, diâmetro do adipócito e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Em parte, esses efeitos benéficos do EPA foram associados ao aumento no consumo de oxigênio e redução de alguns genes envolvidos com lipogênese/adipogênese nesses animais (LEMIEUX et al., 2015).

Como já mencionado, os animais submetidos à DHL tiveram aumento na glicemia e insulina basais em relação aos animais submetidos à DB. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado que, nas fases iniciais da obesidade, há aumento na secreção de insulina pelo pâncreas, com o objetivo de compensar o aumento da resistência à insulina. A princípio, esse efeito tem caráter benéfico, uma vez que esse aumento está relacionado com a normalização dos níveis glicêmicos. Por outro lado, o efeito crônico dessa hiperinsulinemia, pode levar à falência das células beta do pâncreas, tendo como consequência a redução da secreção de insulina pelo pâncreas, culminando com o aumento na glicemia plasmática, o qual caracteriza o quadro de DM2 (DEFRONZO; ABDUL-GHANI, 2011; DONNELLY et al., 2009; HIRABARA et al., 2010). Em contrapartida, os animais obesos suplementados com o óleo de peixe foram prevenidos contra o aumento na glicemia, normalizando essa variável em relação aos animais tratados com DB. Outros estudos utilizando a suplementação com o óleo de peixe em animais obesos têm encontrado resultados similares aos observados no presente trabalho. Assim, o efeito preventivo observado nos animais submetidos à DHL e suplementados com o óleo de peixe são parcialmente explicados, em parte, pela redução na depleção e expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) no tecido adiposo e músculo esquelético, na redução da enzima glicose-6-fosfato no fígado, a qual contribui para a redução na síntese de glicose e no conteúdo de lipídeos intramiocelulares (DELARUE et al., 2004). Em relação aos resultados no índice HOMA-IR, não foram observadas diferenças significativas nos animais obesos suplementados com o óleo de peixe. Os resultados encontrados no HOMA-IR são opostos aos observados em outros estudos utilizando animais obesos suplementados com o óleo de peixe, os quais demonstraram efeito preventivo no aumento da resistência à insulina (DELARUE et al., 2004; STORLIEN et al., 1997). No entanto, outros estudos utilizando o óleo de peixe em modelos submetidos à DHL não

observaram reduções significativas na resistência à insulina (HIRABARA et al., 2010; ROCHE, 2005). Esses efeitos contraditórios do óleo de peixe em relação à resistência à insulina ainda permanecem por ser elucidados.

Já está bem estabelecido que o treinamento aeróbico moderado reduz o ganho de peso e inflamação, melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, tanto em modelos humanos (GLEESON et al., 2011) quanto em modelos animais (AMARAL et al., 2014; PEREZ-MATUTE et al., 2007). De fato, o treinamento físico aeróbico é uma terapia não farmacológica fundamental que tem sido usado na prevenção e tratamento de diversas doenças e fatores de riscos (DONNELLY et al., 2009; GLEESON et al., 2011). No presente estudo, foi demonstrado que animais obesos submetidos a 12 semanas de protocolo de treinamento aeróbico tiveram menor ganho de peso corporal e depósitos de gorduras (epididimal, retroperitoneal e mesentérica), os quais contribuíram para a redução do índice de adiposidade, apesar do consumo contínuo da DHL. Além do efeito protetor no ganho de peso, o TA foi capaz de normalizar a glicemia basal nos animais obesos, independente da suplementação do óleo de peixe. Isso demonstra que o TA, *per se*, promove redução no ganho de peso, independente da suplementação de óleo de peixe. Esses resultados foram também observados em outros trabalhos que utilizaram o treinamento físico aeróbico em animais submetidos a DHL (GLEESON et al., 2011; JEONG et al., 2015). Nesse sentido, Jeong *et al.* (JEONG et al., 2015) demonstraram que 12 semanas de DHL (45% de lipídios), em camundongos C57BL/6J com idade inicial de 4 semanas, foram suficientes para induzir obesidade ao final do protocolo experimental. Por outro lado, os animais obesos submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico, realizado 5 vezes por semana, 30-60 min/dia, com velocidade de 20-22 m/min por 12 semanas, foi capaz de prevenir o ganho de peso nos animais submetidos à DHL, sugerindo o efeito protetor do treinamento físico no ganho de peso corporal. O principal mecanismo para esse efeito ainda não está bem estabelecido. Porém, diversos trabalhos têm demonstrado que a prática regular de treinamento físico aeróbico estimula a biogênese mitocondrial, consumo de oxigênio, capilarização (angiogênese), conteúdo de triglicerídeos intramiocelulares (TIM) e estoques de glicogênio, o que por sua vez contribui para a mudança no substrato utilizado, poupando glicogênio e oxidando mais lipídeos, contribuindo para a redução do peso corporal (DONNELLY et al., 2009; HAWLEY et al., 2014; STANFORD; GOODYEAR, 2014).

Os animais submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico demonstraram uma melhora no desempenho após ao término do protocolo experimental de 12 semanas de treinamento, como observado pelo aumento na distância total percorrida (m). De fato, outros trabalhos que utilizaram o treinamento em animais obesos demonstram resultados similares na melhora do desempenho (DELDICQUE et al., 2013). Outro ponto importante que deve ser ressaltado é que o treinamento aeróbico melhorou o desempenho em todos os grupos, independente da dieta e da suplementação com o óleo de peixe. A melhora do desempenho observado nos animais treinados foi associada ao aumento na atividade da enzima citrato sintase e da proteína PGC1 α , independente da dieta e da suplementação como AG-W3. Por outro lado, houve uma redução na expressão da proteína PGC1 α nos animais sedentários submetidos à DHL. Uma possível explicação para essa redução da proteína PGC1 α nos animais obesos sedentários seria por conta do efeito lipotóxico no músculo esquelético, o qual não foi avaliado no presente estudo. De fato, já está bem estabelecido que o treinamento aeróbico é capaz de estimular a biogênese e função mitocondrial por aumentar a expressão da proteína PGC1 α , além de aumentar a beta-oxidação, tendo como consequência uma mudança na preferência do substrato utilizado energética em exercícios com características submáximas (oxidação preferencial de mais lipídios ao invés poupa de glicose/a glicogênio), aumento da capilarização (angiogênese), tendo como consequência a melhora do desempenho aeróbico (CALVO et al., 2008; COFFEY; HAWLEY, 2007; HOLLOSZY, 1976). Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos avaliados (sedentários ou treinados) no presente estudo em relação ao peso e à área de secção transversa do músculo gastrocnêmio. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nos parâmetros supracitados, ao final das 12 semanas de protocolo experimental, os animais dos grupos tratados com a DB ou DHL, submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico, demonstraram uma melhora no desempenho aeróbico durante o teste para avaliar a distância total percorrida, independente da suplementação com o AG-W3. Demonstrando que, de fato, o treinamento é o fator que determinante dessa melhora. Porém, houve diferença nos animais tratados com DHL obesos submetidos ao protocolo de treinamento em relação ao seu respectivo grupo controle.

Em relação ao efeito da dieta no músculo gastrocnêmio, não foram observadas diferenças significativas no peso do músculo e na área de secção transversa em nenhum dos grupos estudados. De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que períodos curtos de DHL, 4 a 6 semanas, podem aumentar o peso do músculo por conta do aumento do peso corporal nos animais

submetidos à DHL, o que mimetiza o aumento da sobrecarga similar ao treino de força, dessa maneira, contribuindo para o aumento maior da síntese proteica muscular (GUILLET et al., 2012; MASGRAU et al., 2012). Os animais precisam deslocar muito mais peso do que os animais controles e, associado com a hiperinsulinemia, isso iria contribuir para o aumento da massa muscular similar ao treinamento. Por outro lado, em trabalhos com períodos mais longos de dieta (maiores que 14 semanas), são observadas reduções na síntese proteica, refletindo na redução da massa muscular esquelética, caracterizando a resistência anabólica (GUILLET et al., 2012; MASGRAU et al., 2012; TARDIF et al., 2014). Um dos possíveis efeitos relacionados a esse fenômeno seria o aumento no conteúdo de triglicerídeos intramiocelulares, consequência da saturação da capacidade de armazenamento de lipídios pelo tecido adiposo, tendo como consequência o direcionamento dos lipídios para o músculo esquelético, o que iria contribuir para o aumento na resistência à insulina por conta do possível efeito lipotóxico e da redução na função mitocondrial (MASGRAU et al., 2012; STEPHENS et al., 2015). Apesar da insulina não ser determinante no processo de síntese proteica, ela tem um efeito permissivo na ativação da via da mTOR, tendo um possível papel no desenvolvimento da resistência anabólica e consequentemente prejudicando o processo de síntese proteica (MASGRAU et al., 2012; SAVAGE et al., 2007; STEPHENS et al., 2015). Misgrau et al, avaliaram o efeito de 16 e 24 semanas de uma dieta rica em lipídios e em sacarose (17% de proteínas, 45% de lipídios e 30% de carboidratos) no músculo sóleo (oxidativo) e tibial anterior (TA) (glicolítico) de ratos Wistar. Ao final de 16 semanas de protocolo experimental os pesquisadores observaram um aumento no ganho de peso corporal, massa gorda e na síntese proteica no músculo tibial anterior em relação aos animais que receberam a dieta padrão. Nessa primeira fase do estudo, os autores não observaram aumento no conteúdo de lipídeos intramiocelulares (LIM) no músculo tibial anterior. O objetivo da segunda parte do protocolo experimental foi comparar os efeitos de 16 *versus* 24 semanas de DHL. Ao final da 24^a semana, foi observada estabilização no ganho de peso corporal e redução no peso do músculo tibial anterior, o qual foi associado à redução na taxa de síntese proteica. Essa redução na síntese pode ter relação com o aumento no conteúdo de LIM no músculo tibial anterior. Os autores sugerem que esse acúmulo de LIM pode ter contribuído para os efeitos deletérios da DHL, reduzindo a incorporação de aminoácidos no músculo esquelético.

Apesar da razão fosforilada pela total da proteína Akt ter sido reduzida nos animais obesos sedentários e treinados, não foram observadas diferenças significativas na razão da

proteína S6k. O qual sugere que a DHL não promoveu RA. Por outro lado houve uma redução na razão da S6k nos animais DB submetidos ao treinamento físico aeróbico, independente da suplementação com o AG-W3. Já está bem estabelecido que o treinamento aeróbico não tem como característica principal o aumento da massa muscular, por não estimular o aumento da síntese de miofibrilas, mas sim de mitocôndrias (BAAR, 2006; 2014; HAWLEY et al., 2014). Ao contrário das adaptações observadas com o treino de força, o treinamento aeróbico promove alterações metabólicas distintas, tais como aumento na razão da adenosina monofosfato *versus* adenosina trifosfato (AMP:ATP) e na nicotinamida adenina dinucleotídeo ($\text{NAD}^+:\text{NADH}$), além do aumento nas concentrações de cálcio intracelulares e na produção de espécies reativas de oxigênio (BAAR, 2006; 2014; HAWLEY et al., 2014). Baar, k 2014-2006 – Coffey, 2007 – Fyfe, JJ - 2014). O aumento na razão AMP:ATP estimula a ligação da AMP com a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Uma vez ativada, a proteína AMPK promove efeito inibitório sobre a Akt. Essa inibição somente é observada quando a porção catalítica $\alpha 1$ (AMPK $\alpha 1$) é ativada. Apesar da AMPK $\alpha 1$ não ter sido avaliada no presente estudo, estudos são sugestivos de que a expressão dessa proteína também tenha sido estimulada, uma vez que essa resposta é característica desse tipo de protocolo. Uma vez ativada, a AMPK $\alpha 1$ promove potente efeito inibitória na ativação da mTOR, por estimular a ativação da TSC2, que por sua vez inibe a proteína Rheb, limitando o processo de síntese proteica. Athertton *et al.* (2005) foram um dos primeiros grupos a demonstrarem, em animais de experimentação, que a estimulação elétrica em fibras isoladas, mimetizando as mesmas condições observadas no treino de força e o treino aeróbico (3h a 10Hz), promovem adaptações distintas. Eles demonstraram que a fibra isolada submetida a 6 séries de 3 segundos de repetição, a 100 Hz por 20 min, mimetizando o treino de força, é capaz de ativar a via Akt/mTOR, tendo efeito insignificante na ativação das proteínas AMPK e PGC1 α . Por outro lado, as fibras isoladas que foram submetidas ao protocolo que mimetizava o treino aeróbico, foram capazes de aumentar a fosforilação da proteína AMPK e PGC1 α , porém os autores observaram efeito inibitório na via da Akt/mTOR. Os autores sugeriram que a AMPK e PGC1 α estão envolvidas na inibição da via Akt/mTOR e isso determina as adaptações para cada tipo de treino. Ikoni *et al.* (2003) já haviam demonstrado, em 2003, que a ativação da AMPK promove a fosforilação e ativação da proteína responsável por inibir a ativação da Akt, a proteína tuberina (TSC2). A TSC2, quando ativada, tem potente efeito inibitório sobre a proteína Akt, levando, conseqüentemente, à inativação da proteína mTORC1 e

redução da ativação dos seus respectivos alvos, a proteína S6k e a 4EBP1, resultando na inibição da síntese proteica muscular (BAAR, 2014; COFFEY; HAWLEY, 2007; FYFE et al., 2014). Os estudos supracitados corroboram os resultados achados no presente estudo, onde foi demonstrado que o protocolo de 12 semanas de treinamento aeróbico, foi capaz de aumentar a expressão da PGC1 α , como esperado. Outro possível mecanismo mediado pela AMPK é a ativação da quinase do fator de alongamento 2 (eIF2K). Já é bem estabelecido que o treinamento aeróbico é capaz de ativar a proteína quinase eIF2K. Uma vez ativada pela AMPK, a eIF2K fosforila e inativa a proteína eIF2, reduzindo o processo de síntese proteica (FYFE et al., 2014).

Outra proteína que é estimulada pelo treinamento aeróbico e que pode influenciar no processo de síntese proteica é a deacetilase da família das sirtuínas, a SIRT1. Gosh *et al.* (2010) demonstraram que a proteína SIRT1 é estimulada quando há algum estresse metabólico, como observado no exercício aeróbico (Philp A. 2011). Diversos trabalhos têm demonstrado que a SIRT1 tem a capacidade de controlar a atividade da AMPK e PGC1 α , o que estimularia a biogênese mitocondrial e melhora o desempenho aeróbico (FYFE et al., 2014). A proteína SIRT1 também tem a capacidade de promover a ativação da TSC2, tendo como consequência a inibição da proteína Rheb, inativando a ativação da mTORC1 e seus potenciais alvos, a proteína S6k e a 4EBP1, reduzindo a síntese proteica. Apesar de não ter sido avaliada no presente estudo, já é bem estabelecido que o treinamento aeróbico estimula o aumento na atividade da SIRT1, sugerindo que a via AMPK/SIRT1 associada à PGC1 α pode estar envolvida com a redução da síntese proteica observada nos animais submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico. Além disso, a proteína AMPK também poderia estar envolvida no aumento da degradação proteica por ativar a proteína FOXO3a, que por sua vez, aumentaria a ativação da proteína Ulk1, estimulando o processo de autofagia (SANCHEZ et al., 2012).

Em relação as vias de degradação proteica no músculo esquelético, não foram observadas diferenças significativas na expressão da proteína MuRF1 em nenhum dos grupos analisados. Porém, foram observadas diferenças na expressão da proteína MAFbx somente nos animais submetidos ao treinamento aeróbico da DB. De fato, já está bem estabelecido que o treinamento aeróbico promove o aumento nas vias de degradação (LO VERSO et al., 2014; SMILES et al., 2015). Esse efeito contribuiria para a remoção das proteínas danificadas durante o treinamento. Essas proteínas, após serem degradadas em pequenos peptídeos, seriam posteriormente reincorporadas no músculo esquelético, contribuindo para a manutenção da massa muscular. Uma

das possibilidades para o não aumento observado na atividade do SUP seria o tempo da última sessão de treino até a eutanazia dos animais, uma vez que os trabalhos demonstram que há aumento imediatamente após a sessão de treino, o que facilitaria a remoção das proteínas danificadas. No entanto, a atividade do SUP caiu ao longo do tempo (BAEHR et al., 2014).

De fato, alguns estudos utilizando modelos de obesidade induzida pela DHL têm demonstrado aumento em alguns componentes relacionados a degradação proteica. Sishi *et al.* (2010) demonstraram que ratos submetidos a 16 semanas de dieta (65% de carboidratos, 19% de proteínas e 16% de gordura), desenvolveram resistência a insulina, inflamação e atrofia muscular esquelética quando comparado aos animais submetidos à DB. Os autores sugeriram que esse efeito foi mediado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α), apoptose (via caspase 3) e elevação da ubiquitina ligase MuRF1. Além disso, os autores também observaram redução na fosforilação da proteína FOXO. Quando fosforilado, o FOXO move-se para fora do núcleo da célula, prevenindo a ativação dos genes relacionados à degradação proteica, como as E3 ligases MuRF1 e MAFbx (BODINE, 2013).

A grande diferença entre o trabalho supracitado com o nosso é a quantidade de carboidratos na dieta, que, classicamente, induz inflamação, e o tempo de tratamento longo (16 semanas). Como já mencionado, os trabalhos que demonstraram algum prejuízo na massa muscular esquelética utilizaram períodos longos de tratamento (maiores que 14 semanas). Associado ao tempo de tratamento, as dietas utilizadas nesses estudos, na sua grande maioria, induziram inflamação. Na dieta utilizada no presente projeto, não observamos elevações nos marcadores inflamatórios no músculo esquelético (dados não mostrados). A ausência de inflamação no músculo esquelético pode ter contribuído, em parte, para o não desenvolvimento das anormalidades encontradas quando comparado a outras dietas que induzem inflamação. Outro componente importante da degradação proteica no músculo esquelético, o proteassoma, também não foi alterado após 12 semanas de protocolo experimental, em nenhum dos grupos estudados. Até o presente momento, não existem trabalhos avaliando a atividade do SUP em músculo esquelético de animais obesos. Por esse motivo, esse sistema foi avaliado no presente estudo. Porém, não foram observadas diferenças na atividade do proteassoma na porção $\beta 5$ dependente de ATP em nenhum dos grupos estudados. Em relação a cathepsina L, houve redução na sua atividade somente no grupo tratado com DHL submetido ao treinamento aeróbico em relação ao grupo submetido à DB não treinado.

Outro fator que pode contribuir para os prejuízos observados no músculo esquelético observados em animais submetidos à DHL é o aumento do estresse de retículo endoplasmático (ERE). Diversos trabalhos têm demonstrado que animais obesos aumentam alguns marcadores do ERE, o qual contribui para a redução na síntese proteica muscular (DELDICQUE, 2013; DELDICQUE et al., 2010). No presente trabalho, 8 semanas de dieta não foram capazes de induzir o aumento de marcadores do ERE nos animais submetidos à DHL sem treinamento. Deldicque *et al.* (2010) realizaram dois protocolos experimentais para induzir obesidade em camundongos C57Bl6/J. O primeiro protocolo utilizou a DHL (70% de gordura, 1% de carboidrato) por um período de 6 semanas. Após esse período, os autores observaram aumento em alguns marcadores do ERE, como as proteínas BiP, IRE1 e MBTPS2 no músculo sóleo e aumento da proteína ATF4 no músculo tibial. No segundo protocolo experimental, os pesquisadores utilizaram composição diferente da DHL (46% de gordura e 35% de carboidrato), por 20 semanas. Após esse período, foi observado aumentos no BiP, IRE1 e a porção fosforilada da proteína ERK, além de maior expressão das proteínas CHOP e XBP1. Além dos experimentos *in vivo*, os autores realizaram experimentos com células C2C12. Eles demonstraram que a adição de ácido palmítico foi capaz de reduzir a fosforilação da proteína S6k, sugerindo menor ativação da mTORC1 e, conseqüentemente, redução da síntese proteica *in vitro* (DELDICQUE et al., 2010).

Por outro lado, os animais tratados com DHL obesos submetidos ao treinamento físico aeróbico, suplementados com AG- ω 3, apresentaram redução na expressão da proteína BiP. Interessantemente, não foram observadas alterações na proteína CHOP em nenhum dos grupos estudados, tanto aqueles tratados com DB quanto com DHL. Nos animais tratados com DB, submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico (independente da suplementação com o AG-W3), houve aumento na expressão proteica da PDI, em relação aos animais DB sedentários. Assim, Deldicque *et al.* (2012) demonstraram que 6 semanas de DHL foi capaz de aumentar o ERE e a inflamação, além de induzir obesidade. Em contrapartida, os animais tratados com DHL, submetidos ao protocolo de treinamento aeróbico, tiveram redução nos níveis de inflamação, porém, não foram capazes de restaurar o ERE. Os autores sugeriram que o aumento no ERE nos animais obesos, submetidos ao treinamento, seria importante para estimular as adaptações induzidas pelo exercício.

Com os resultados do presente estudo são sugestivos de que o óleo de peixe é capaz de prevenir parcialmente algumas alterações metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica e que o treinamento físico aeróbico, além de atenuar os parâmetros metabólicos, também melhora a capacidade funcional, prevenindo as complicações associadas à dieta hiperlipídica. A associação do óleo de peixe com o treinamento físico aeróbico promoveu efeitos similares aos observados nos grupos submetidos ao treinamento. Desse modo, os nossos resultados demonstram que o treinamento físico aeróbico foi capaz de atenuar e restaurar alguns parâmetros relacionados a DHL, independente da suplementação com o óleo de peixe.

8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo são sugestivos de que: 1) a suplementação com o óleo de peixe em camundongos C57BL6/J tratados com dieta hiperlipídica é eficiente em prevenir parcialmente alguns efeitos deletérios relacionados à composição corporal e metabolismo; 2) o treinamento físico aeróbico é capaz de atenuar várias alterações induzidas pela DHL, independente da suplementação com o óleo de peixe, com relação ao ganho de peso, glicemia e insulina de jejum, índice HOMA-IR, além de melhorar a distância total percorrida, citrato sintase e expressão da proteína PGC1 α ; e 3) a associação entre treinamento físico aeróbico e a suplementação com óleo de peixe não potencializou os resultados observados nos animais treinados. Desse modo, o treinamento físico aeróbico é determinante na melhora das alterações deletérias induzidas pela dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, J. M., 2ND et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. Diabetes, v. 53, n. 1, p. 25-31, 2004.
- ALP, P. R. et al. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochem. J., v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.
- AMARAL, C. L. et al. DNA Methylation Changes Induced by a High-Fat Diet and Fish Oil Supplementation in the Skeletal Muscle of Mice. J. Nutrigenet. Nutrigenomics., v. 7, n. 4-6, p. 314-326, 2014.
- ANDERSON, S. R. et al. Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. Metabolism, v. 57, n. 3, p. 347-354, 2008.
- ATTAIX, D. et al. Muscle wasting: a crosstalk between protein synthesis and breakdown signalling. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., v. 15, n. 3, p. 209-210, 2012.
- AUAIS, M. A. et al. Extended exercise rehabilitation after hip fracture improves patients' physical function: a systematic review and meta-analysis. Phys. Ther., v. 92, n. 11, p. 1437-1451, 2012.
- BAAR, K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. Med. Sci. Sports. Exerc., v. 38, n. 11, p. 1939-1944, 2006.
- BAAR, K. Using molecular biology to maximize concurrent training. Sports. Med., v. 44 Suppl 2, p. S117-125, 2014.
- BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am. J. Physiol., v. 276, n. 1 Pt 1, p. C120-127, 1999.
- BAEHR, L. M. et al. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. Front. Physiol., v. 5, p. 69, 2014.
- BECK, S. A. et al. Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. Cancer. Res., v. 51, n. 22, p. 6089-6093, 1991.
- BODINE, S. C. Disuse-induced muscle wasting. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 45, n. 10, p. 2200-2208, 2013.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat. Cell. Biol., v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

BOURGEOIS, F. et al. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. Br. J. Nutr., v. 49, n. 1, p. 17-26, 1983.

BUETTNER, R. et al. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity. (Silver Spring), v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

CALVO, J. A. et al. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. J. Appl. Physiol. (1985), v. 104, n. 5, p. 1304-1312, 2008.

CATTA-PRETA, M. et al. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. Nutrition, v. 28, n. 2, p. 212-219, 2012.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. Sports. Med., v. 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

DEFRONZO, R. A.; ABDUL-GHANI, M. Type 2 diabetes can be prevented with early pharmacological intervention. Diabetes. Care., v. 34 Suppl 2, p. S202-209, 2011.

DELARUE, J. et al. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? Reprod. Nutr. Dev., v. 44, n. 3, p. 289-299, 2004.

DELDICQUE, L. Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia? Front. Physiol., v. 4, p. 236, 2013.

DELDICQUE, L. et al. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. J. Physiol. Biochem., v. 69, n. 2, p. 215-225, 2013.

DELDICQUE, L. et al. The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., v. 299, n. 5, p. E695-705, 2010.

DONNELLY, J. E. et al. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. Med. Sci. Sports. Exerc., v. 41, n. 2, p. 459-471, 2009.

DRUMMOND, M. J. et al. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. J. Physiol., v. 587, n. Pt 7, p. 1535-1546, 2009.

DRUMMOND, M. J.; RASMUSSEN, B. B. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., v. 11, n. 3, p. 222-226, 2008.

DUTT, V. et al. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. Pharmacol. Res., v. 99, p. 86-100, 2015.

DUVIGNEAUD, N. et al. Relationship of obesity with physical activity, aerobic fitness and muscle strength in Flemish adults. J. Sports. Med. Phys. Fitness., v. 48, n. 2, p. 201-210, 2008.

FALK, B. et al. The association between adiposity and the response to resistance training among pre- and early-pubertal boys. J. Pediatr. Endocrinol. Metab., v. 15, n. 5, p. 597-606, 2002.

FINKELSTEIN, E. A. et al. The costs of obesity in the workplace. J. Occup. Environ. Med., v. 52, n. 10, p. 971-976, 2010.

FOGELHOLM, M. et al. Waist circumference and BMI are independently associated with the variation of cardio-respiratory and neuromuscular fitness in young adult men. Int. J. Obes. (Lond.), v. 30, n. 6, p. 962-969, 2006.

FRANCH, H. A.; PRICE, S. R. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., v. 8, n. 3, p. 271-275, 2005.

FREY, J. W. et al. A role for Raptor phosphorylation in the mechanical activation of mTOR signaling. Cell. Signal., v. 26, n. 2, p. 313-322, 2014.

FYFE, J. J. et al. Interference between concurrent resistance and endurance exercise: molecular bases and the role of individual training variables. Sports. Med., v. 44, n. 6, p. 743-762, 2014.

GLASS, D. J. Signaling pathways perturbing muscle mass. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., v. 13, n. 3, p. 225-229, 2010.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat. Rev. Immunol., v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol. Rev., v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein turnover in skeletal muscle. I. Protein catabolism during work-induced hypertrophy and growth induced with growth hormone. J. Biol. Chem., v. 244, n. 12, p. 3217-3222, 1969.

GOLL, D. E. et al. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. J. Anim. Sci., v. 86, n. 14 Suppl, p. E19-35, 2008.

GOMES, A. V. et al. Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. FASEB. J., v. 26, n. 7, p. 2986-2999, 2012.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

GUILLET, C. et al. Impaired protein metabolism: interlinks between obesity, insulin resistance and inflammation. Obes. Rev., v. 13 Suppl 2, p. 51-57, 2012.

HAINAULT, I. et al. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. Ann. N Y. Acad. Sci., v. 683, p. 98-101, 1993.

HAN, D. H. et al. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. Diabetes, v. 46, n. 11, p. 1761-1767, 1997.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutr. Res. Rev., v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. Cell, v. 159, n. 4, p. 738-749, 2014.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem., v. 67, p. 425-479, 1998.

HIRABARA, S. M. et al. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. J. Cell. Physiol., v. 222, n. 1, p. 187-194, 2010.

HOLLOSZY, J. O. Adaptations of muscular tissue to training. Prog. Cardiovasc. Dis., v. 18, n. 6, p. 445-458, 1976.

ILICH, J. Z. et al. Interrelationship among muscle, fat, and bone: Connecting the dots on cellular, hormonal, and whole body levels. Ageing. Res. Rev., v. 15C, p. 51-60, 2014.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., v. 287, n. 4, p. C834-843, 2004.

JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Translational control of protein synthesis: implications for understanding changes in skeletal muscle mass. Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab., v. 11 Suppl, p. S143-149, 2001.

JEONG, J. H. et al. Moderate exercise training is more effective than resveratrol supplementation for ameliorating lipid metabolic complication in skeletal muscle of high fat diet-induced obese mice. J. Exerc. Nutrition. Biochem., v. 19, n. 2, p. 131-137, 2015.

JORGENSEN, T. et al. One-year high fat diet affects muscle-but not brain mitochondria. J. Cereb. Blood. Flow. Metab., 2015.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. J. Biol. Chem., v. 285, n. 38, p. 29027-29032.

LEE, M. S. et al. Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Genes. Nutr., v. 2, n. 4, p. 327-330, 2008.

LEMIEUX, M. J. et al. Eicosapentaenoic acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an adiposity-independent manner. J. Nutr., v. 145, n. 3, p. 411-417, 2015.

LIMA, E. A. et al. Macadamia oil supplementation attenuates inflammation and adipocyte hypertrophy in obese mice. Mediators. Inflamm., v. 2014, p. 870634, 2014.

LO VERSO, F. et al. Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity. Autophagy, v. 10, n. 11, p. 1883-1894, 2014.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. J. Nutr. Biochem., v. 17, n. 1, p. 1-13, 2006.

LOVEJOY, J. C. The influence of dietary fat on insulin resistance. Curr. Diab. Rep., v. 2, n. 5, p. 435-440, 2002.

MARCOTTE, G. R. et al. The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. Calcif. Tissue. Int., v. 96, n. 3, p. 196-210, 2015.

MASGRAU, A. et al. Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. J. Physiol., v. 590, n. Pt 20, p. 5199-5210, 2012.

MASI, L. N. et al. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. J. Biomed. Biotechnol., v. 2012, p. 945131, 2012.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MOUSSAVI, N. et al. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? Obesity. (Silver Spring)., v. 16, n. 1, p. 7-15, 2008.

NIELSEN, J. N.; RICHTER, E. A. Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise. Acta. Physiol. Scand., v. 178, n. 4, p. 309-319, 2003.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of obesity in the United States. JAMA, v. 312, n. 2, p. 189-190, 2014.

PARR, E. B. et al. 'Sarcobesity': a metabolic conundrum. Maturitas, v. 74, n. 2, p. 109-113, 2013.

PARRA, D. et al. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. Appetite, v. 51, n. 3, p. 676-680, 2008.

PEREZ-MATUTE, P. et al. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. Br. J. Nutr., v. 97, n. 2, p. 389-398, 2007.

PHILLIPS, S. M. Nutritional Supplements in Support of Resistance Exercise to Counter Age-Related Sarcopenia. Adv. Nutr., v. 6, n. 4, p. 452-460, 2015.

PHILLIPS, S. M. et al. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. J. Appl. Physiol., v. 107, n. 3, p. 645-654, 2009.

RANTANEN, T. et al. Muscle strength and body mass index as long-term predictors of mortality in initially healthy men. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., v. 55, n. 3, p. M168-173, 2000.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. Physiol. Rev., v. 93, n. 3, p. 993-1017, 2013.

ROCHE, H. M. Fatty acids and the metabolic syndrome. Proc. Nutr. Soc., v. 64, n. 1, p. 23-29, 2005.

RUIZ, J. R. et al. Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. BMJ, v. 337, p. a439, 2008.

RUZICKOVA, J. et al. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. Lipids, v. 39, n. 12, p. 1177-1185, 2004.

SAMANE, S. et al. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. Metabolism, v. 58, n. 7, p. 909-919, 2009.

SAMUEL, V. T. et al. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. Lancet, v. 375, n. 9733, p. 2267-2277, 2010.

SANCHEZ, A. M. et al. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. J. Cell. Biochem., v. 113, n. 2, p. 695-710, 2012.

SAVAGE, D. B. et al. A clinical approach to severe insulin resistance. Endocr. Dev., v. 11, p. 122-132, 2007.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS. J., 2013.

SCHWARTZ, A. L.; CIECHANOVER, A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 49, p. 73-96, 2009.

SILVEIRA, L. R. et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. J. Cell. Physiol., v. 217, n. 1, p. 1-12, 2008.

SISHI, B. et al. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. Exp. Physiol., v. 96, n. 2, p. 179-193, 2011.

SITNICK, M. et al. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. J. Physiol., v. 587, n. Pt 23, p. 5753-5765, 2009.

SMILES, W. J. et al. Modulation of autophagy signaling with resistance exercise and protein ingestion following short-term energy deficit. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 309, n. 5, p. R603-612, 2015.

SPRIET, L. L. New insights into the interaction of carbohydrate and fat metabolism during exercise. Sports. Med., v. 44 Suppl 1, p. S87-96, 2014.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. Adv. Physiol. Educ., v. 38, n. 4, p. 308-314, 2014.

STENHOLM, S. et al. Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., v. 11, n. 6, p. 693-700, 2008.

STENHOLM, S. et al. Association between obesity history and hand grip strength in older adults--exploring the roles of inflammation and insulin resistance as mediating factors. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., v. 66, n. 3, p. 341-348.

STEPHENS, F. B. et al. Lipid-induced insulin resistance is associated with an impaired skeletal muscle protein synthetic response to amino acid ingestion in healthy young men. Diabetes, v. 64, n. 5, p. 1615-1620, 2015.

STORLIEN, L. H. et al. Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids., v. 57, n. 4-5, p. 379-385, 1997.

TARDIF, N. et al. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. Aging. Cell., v. 13, n. 6, p. 1001-1011, 2014.

TERZIS, G. et al. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. Eur. J. Appl. Physiol., v. 102, n. 2, p. 145-152, 2008.

VIGTEL, Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf> 2014. Acesso em 08/09/2015

WANG, L. et al. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. J. Biol. Chem., v. 282, n. 27, p. 20036-20044, 2007.

WATSON, K.; BAAR, K. mTOR and the health benefits of exercise. Semin. Cell. Dev. Biol., v. 36, p. 130-139, 2014.

WELLE, S.; NAIR, K. S. Relationship of resting metabolic rate to body composition and protein turnover. Am. J. Physiol., v. 258, n. 6 Pt 1, p. E990-998, 1990.

WHITEHOUSE, A. S. et al. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. Cancer. Res., v. 61, n. 9, p. 3604-3609, 2001.

WHITEHOUSE, A. S.; TISDALE, M. J. Downregulation of ubiquitin-dependent proteolysis by eicosapentaenoic acid in acute starvation. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 285, n. 3, p. 598-602, 2001.

WHO, Obesity and Overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 2015. Acesso em 08/09/2015

WING, S. S. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 37, n. 10, p. 2075-2087, 2005.

YOU, J. S. et al. Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2 α . J. Nutr. Biochem., v. 21, n. 10, p. 929-934, 2010.

ZURLO, F. et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. J. Clin. Invest., v. 86, n. 5, p. 1423-1427, 1990.

**ANEXO – Relatório da Professora Sue C. Bodine sobre o estágio sanduíche do aluno Luís
Gustavo Oliveira de Sousa**

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, DAVIS

BERKELEY • DAVIS • IRVINE • LOS ANGELES • MERCED • RIVERSIDE • SAN DIEGO • SAN FRANCISCO

SANTA BARBARA • SANTA CRUZ

COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF NEUROBIOLOGY,
PHYSIOLOGY, AND BEHAVIOR
(530) 752-0203
FAX: (530) 752-5582

ONE SHIELDS AVENUE
DAVIS, CALIFORNIA 95616-8519
INTERNET: <http://www.apb.ucdavis.edu>

March 26, 2015

Final Report on Luís Gustavo Oliveira de Sousa

To Whom It May Concern:

This letter confirms that **Luís Gustavo Oliveira de Sousa**, a Ph.D. candidate at the Institute of Biomedical Sciences Sao Paulo University, worked in the laboratory of Dr. Sue Bodine Department of Neurobiology, Physiology and Behavior at the University of California Davis for a period of one year and was very productive. During the period from Feb 2014 to March 2015, Mr de Sousa worked on his project , *"Effect of n-3 fatty acid supplementation on atrophy induced by hindlimb suspension and hypertrophy induced by reweighting in C57Bl/6 mice fed a high-fat diet"*, and also assisted with other projects in the Bodine laboratory.

Gustavo de Sousa was a highly motivated and dedicated student and accomplished his major goals, which were to learn new methodologies such as the measurement of calpain activity, Cathepsin L activity, 20S and 26S proteasome activities and protein translations using the SuNSET technique. He also learned to perform the tail suspension protocol in mice. Gustavo fulfilled the objectives of his proposal by completing a project that involved feeding C57BL6 mice a high fat diet for a period of 16 weeks. The mice were then suspension for a period of 14 days atrophy and then allowed to recover for 7 or 14 days. The goal of this project was to examine the effects of diet-induced obesity on muscle disuse-induced muscle atrophy and the recovery of muscle mass following atrophy. Gustavo performed all of the experiments, removed tissues samples, and made all of the measurements. His data is of high quality and will be submitted as an abstract to an International scientific conference.

In addition to working on his own project, Gustavo also made significant contributions to several other projects in the laboratory. One project involved the examination of disuse-induced muscle atrophy in MuRF1 KO mice. Gustavo performed all of the hind limb suspension experiments and assisted with the tissue collection. He was also a major contributor to a project that involved the histological analysis of muscle from young and old rats that had been subjected to hind limb unloading and reloading for variable lengths of time. Because of his contributions to this aging project, he will be listed as an author when these data are submitted for publication.

In summary, Gustavo is an outstanding, hard-working student, who made significant contributions to my laboratory during the past year. It was a pleasure to have him in the laboratory. He is a strong team player and worked well with everyone in the laboratory.

Sincerely,

Sue Bodine, Ph.D.

Professor

Departments of Neurobiology, Physiology and Behavior & Physiology and Membrane Biology

sbodine@ucdavis.edu