UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Area de Nutrição Experimental

Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido em
marcadores de resistência à insulina de ratas
ovariectomizadas.

Daiana Vianna

Tese para obtenção do Título de DOUTOR.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Area de Nutrição Experimental

Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido em
marcadores de resistência à insulina de ratas
ovariectomizadas.

Daiana Vianna

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Vianna, Daiana
V617ef Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido em
marcadores de resistência à insulina de ratas ovariectomizadas /
Daiana Vianna. - São Paulo, 2015.
89p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental
Orientador : Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Dieta de baixo valor calórico 2. Idosos 3. Exercício físico
I. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Daiana Vianna

Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido em
marcadores de resistência à insulina de ratas
ovariectomizadas.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**Dedico aos meus pais, irmãos, namorado – meus grandes amigos,
companheiros e incentivadores, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de uma longa caminhada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço, primeiramente, a Deuse Nossa Senhora, por tornar tudo isso possível e por me mostrar, através de coisas simples, o seu amor e cuidado para comigo.

À minha mãe, Marli Vianna (em memória) que é meu exemplo de vida – pessoa íntegra e amorosa. Sei que você está comigo em todos os meus passos e sinto que em breve estaremos juntas novamente. Te amo!

À minha família, agradeço pelo amor, educação, incentivo, cuidado e paciência. Pai, obrigada por todo carinho, pelas opiniões e pela lição de vida. Soraya, obrigada por fazer parte da nossa família e por me presentear com mais dois irmãos. Aos meus irmãos, Márcio Vianna, Dominique Vicente Vianna e Ciro Clemente Vicente Vianna, obrigada por existirem na minha vida e por torná-la mais linda: amo incondicionalmente vocês.

À minha segunda família, a família Machado, por todo amor, carinho, paciência, apoio e por vibrarem junto comigo a cada conquista. Silvia e Édna, obrigada por tudo. Sem vocês eu nunca teria chegado aqui. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Fábio Montovani por me ajudar SEMPRE. Por estar ao meu lado em todos os momentos me apoiando e incentivando. Realmente não dá pra descrever aqui o quanto eu sou grata por tudo o que você tem feito por mim. Sua presença na minha vida se tornou algo indispensável. Amo você!

Ao Professor Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, meu orientador, por confiar em mim, me incentivar com conselhos profissionais e pessoais. Por ajudar no meu

crescimento profissional e pessoal. Também sou grata pelo seu exemplo como pesquisador e pela dedicação. Meu muito obrigada.

Ao amigo e professor Gilberto Eiji Shiguemoto, pela consideração, pela dedicação e pelas discussões que foram essenciais para a conclusão dessa jornada. Espero trabalhar mais vezes com você. Muito obrigada por tudo.

Aos amigos dos laboratórios de Bioquímica da Nutrição (FCF/USP) e Laboratório de Fisiologia do Exercício (UFSCar), Ivanir, Anderson, Cecília, Marina, Leo, Markus, Luisa, Nathi, Cris, Gustavo, Fabiano, Rodrigo, Jacque, Vanessa, Kadu, Raquel, Henrique, Kel, Thaís, Audrey e Luciana . Obrigada por toda a ajuda.

Ao Anderson por toda a ajuda no decorrer deste trabalho, com certeza sem você eu não iria chegar até aqui. E obrigada principalmente por fazer parte da minha vida, muito mais do que amigo, como irmão e companheiro. Espero que possamos trabalhar mais vezes juntos. Seria uma honra tê-lo como companheiro de trabalho.

A todos os meus amigos, pelo incentivo e pelos bons momentos que tornaram essa caminhada um pouco mais tranquila.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Ao pessoal da secretaria do departamento, Cleo, Edilson, Mônica e Roberta, e da secretaria de pós-graduação. Em especial ao Jorge Lima, pelo auxílio que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa concedido – processo 2012/21087-4.

RESUMO

VIANNA, D. **Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido em marcadores de resistência à insulina de ratas ovariectomizadas.** 2015. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste estudo, avaliamos o efeito da restrição calórica e do treinamento resistido na massa corporal e na sensibilidade à insulina de ratas ovariectomizadas. 80 ratas fêmeas da linhagem Holtzman foram distribuídas em 8 grupos (n=10 cada): ovariectomizado (OVX), ovariectomizado com restrição calórica (OVX RC), ovariectomizado com treinamento resistido (OVX TR), ovariectomizado com restrição calórica e treinamento resistido (OVX TR+RC), Sham operado (SHAM), Sham com restrição calórica (SHAM RC), sham com treinamento resistido (SHAM TR), sham com restrição calórica e treinamento resistido (SHAM TR+RC). Após 13 semanas de intervenção, foram analisados: massa corporal, gordura corporal; concentrações sanguíneas de glicose, insulina e adiponectina; conteúdo de AKT total e fosforilada, pi3k e Glut 4 (nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal). As ratas ovariectomizadas (OVX, OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC) apresentaram maior massa corporal e gordura corporal quando comparadas ao grupo SHAM. As concentrações de glicose e insulina foram semelhantes em todos os grupos experimentais, porém a concentração de adiponectina foi menor nos grupos ovariectomizados (OVX, OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC), quando comparados ao grupo SHAM. A RC e o TR aumentaram a concentração de adiponectina quando comparado ao grupo OVX. Não houve diferença entre os grupos em relação à via de sinalização da insulina nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal. Concluímos que a ovariectomia causa aumento de massa e gordura corporal, levando à menor concentração de adiponectina, e que a RC e o TR alteram estas modificações.

Palavras-chave: Menopausa. Resistência à insulina. Restrição Calórica. Treinamento resistido. Adiponectina.

ABSTRACT

VIANNA, D. **Effect of calorie restriction and strength training on markers of insulin resistance in ovariectomized rats.** 2015. Doctoral thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this study, we evaluated the effect of calorie restriction and strength training on the body weight and insulin sensitivity of ovariectomized rats. Eighty female Holtzman rats were divided into eight groups (n=10 per group): ovariectomized (OVX), ovariectomized plus calorie restriction (OVX-CR), ovariectomized plus strength training (OVX-ST), ovariectomized plus strength training and calorie restriction (OVX-ST+CR), sham operated (SHAM), sham plus calorie restriction (SHAM-CR), sham plus strength training (SHAM-ST), and sham plus strength training and calorie restriction (SHAM-ST+CR). The following variables were analyzed after 13 weeks of intervention: body weight; body fat; blood concentrations of glucose, insulin and adiponectin; total and phosphorylated AKT content; pi3k and Glut 4 (in subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues). Ovariectomized rats (OVX, OVX-CR, OVX-ST, and OVX-ST+CR) had a higher body weight and body fat than SHAM animals. Glucose and insulin concentrations were similar in all experimental groups, but adiponectin concentration was lower in the ovariectomized groups (OVX, OVX-CR, OVX-ST, and OVX-ST+CR) when compared to the SHAM group. Calorie restriction and ST increased the concentration of adiponectin when compared to the OVX group. There was no difference between groups in terms of insulin signaling in subcutaneous or retroperitoneal adipose tissue. We conclude that ovariectomy increases body weight and body fat, reducing adiponectin concentration, and that CR and ST alter these modifications.

Keywords: Menopause. Insulin resistance. Calorie restriction. Strength training. Adiponectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental	30
Figura 2: Delineamento experimental.....	31
Figura 3: Protocolo de treinamento resistido em escada, adaptado de Homberger e Farrar (2004).	33
Figura 4: Organização da carga de carregamento por sessão de treino.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações utilizadas no experimento (AIN-93M Modificada) (REEVES et al., 1993).....	32
Tabela 2: Características metabólicas basais dos grupos experimentais.....	64
Tabela3: Marcadores bioquímicos após 13 semanas de intervenções.....	65
Tabela 4: Velocidade de decaimento da glicose durante o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (kitt).....	66

LISTA DE SIGLAS

ASP	Proteína estimuladora da acilação
E2	Estradiol
CEEA	Comissão de experimentação animal
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FSH	Hormônio Folículo estimulane
GLUT-4	Ransportador de glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IKK	Proteína quinase inibidor do IKB
IRS	Receptor de Insulina
IL-6	Interleucina -6
JAK	Janus quinase
JNK	c-janus-n terminal quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OVX	Ovariectomia
MAPK	Proteína quinase mitogênciã ativada
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio
Pi3K	Fosfotidilinositol-3-quinase
RC	Restrição Calórica
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
Src	Proteína semelhante ao colágeno com homologia
TR	Treino resistido
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
ULDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SIGLAS.....	12
SUMÁRIO	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS	28
4.1.1 Grupos e desenho experimentais.....	28
4.1.2 Ração	31
4.1.3 Ração Restrição Calórica.....	31
4.2 PROTOCOLO DE TREINAMENTO RESISTIDO.....	32
4.2.1 Volume total de carga de carregamento.....	34
4.3 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA	35
4.4 CIRURGIA DE OVARECTOMIA	35
4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE SANGUE E TECIDOS	36
4.6 PARÂMETROS SÉRICOS	37
4.7 PARÂMETROS BIOMOLECULARES	38
4.7.1 Western blotting	38
4.7.2 Extração de Proteína.....	38
4.7.3 Preparo do gel de poliacrilamida	39
4.7.4 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	39

4.7.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	40
4.7.6 Sondagens das proteínas com anticorpos	40
4.7.7 Revelação com sistemas quimioluminescente	41
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 CAPÍTULO 1/ARTIGO 1	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
7 REFERÊNCIAS.....	71
8 ANEXOS	76
ANEXO 1. INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOCTORADO.	77
ANEXO 2. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA).	79
ANEXO 3. FICHA DO ALUNO.....	81
ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES.....	84

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da mulher nos países desenvolvidos passou de 50 anos, no início do século XX, para mais de 80 anos, no início do século atual. No Brasil, 49,6% da população é feminina e 10% das mulheres encontram-se com 50 anos ou mais de idade (IBGE, 2010).

Além da melhora na expectativa de vida, o Brasil passou por transformações sociais e econômicas no século passado que provocaram mudanças importantes no perfil de ocorrências das doenças crônicas não transmissíveis da população, como pode ser notado pela pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2011), que revela que 45% das mulheres brasileiras encontram-se com excesso de peso e que 16% são obesas. A maior prevalência de mulheres obesas está na faixa etária de 55 a 64 anos.

A menopausa é um marco desta fase, correspondendo ao último ciclo menstrual, que acontece geralmente em torno dos 50 anos de idade. Este fenômeno consiste na transição da fase reprodutiva para a fase não reprodutiva, processo dinâmico que ocorre ao longo dos anos. Alguns autores tendem a definir a menopausa após 12 meses de cessação da menstruação, devido à perda da função folicular do ovário (GREENDALE *et al.*, 1999; POLOTSKY & POLOTSKY, 2010). Trata-se de fenômeno que envolve muitas mudanças fisiológicas, principalmente hormonais, incluindo o aumento na produção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise, a redução hepática da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), a perda da produção de hormônios ovarianos, como estradiol (E2), e a redução da circulação de andrógenos (POLOTSKY & POLOTSKY, 2010).

Além da perda da produção de hormônios ovarianos, a menopausa está relacionada com alterações no peso corporal. Nesse aspecto, estudos utilizando ratas ovariectomizadas (OVX) mostraram que estes animais apresentam maior peso corporal e maiores depósitos de gorduras quando comparados aos animais do grupo controle (VASCONCELLOS *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2009; ZOTH *et al.*, 2010; DOMINGOS *et al.*, 2012; SHIGUEMOTO *et al.*, 2012).

A ovariectomia tem sido usada em modelo animal por simular a menopausa humana. Estudos mostram que a ovariectomia está associada ao aumento do risco de doenças coronarianas, às perdas ósseas, às alterações lipídicas e às mudanças na composição corporal, como redução da massa magra e aumento da gordura corporal (KALU, 1991; THOMPSON *et al.*, 2005; SHIGUEMOTO *et al.*, 2007). Alguns autores, contudo, sugerem que o aumento de peso das mulheres é mais consistente com o envelhecimento cronológico e não exclusivamente devido à transição da menopausa (WILDMAN & SOWERS, 2011).

É fato conhecido que o envelhecer implica em modificações na composição corporal, na redução do teor de água, no declínio da massa muscular esquelética, na diminuição dos hormônios anabólicos e da força, além de aumento de mediadores inflamatórios e acúmulo de gordura corporal. Estas mudanças, associadas à idade, são responsáveis pela redução da mobilidade e pelo aumento da dependência e da incapacidade funcional (SILVA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2006). Com base nesta teoria, foi realizado um estudo em nosso laboratório que mostrou que ratos envelhecidos possuem mais gordura corporal, níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol e triglicérides e redução da massa magra quando comparados a animais jovens (VIANNA *et al.*, 2012).

Estas alterações que ocorrem na composição corporal influenciam o gasto energético, podendo contribuir para o ganho de peso. Nesse sentido, o estudo de Lovejoy *et al.* (2008) mostrou redução no gasto energético de mulheres menopausadas comparadas com pré-menopausadas. Os autores explicam que este declínio do gasto energético está associado à inatividade física (sedentarismo), à redução da massa magra e à perda da fase lútea que ocorrem na menopausa. Alterações na distribuição da gordura corporal, tanto na gordura visceral e quanto na subcutânea, são modificações atribuídas tanto para o envelhecimento quanto para a menopausa. Porém, na menopausa, há alteração da taxa de andrógenos e estrógenos que estão relacionados com o aumento da deposição de gordura corporal, o que media a resistência à insulina, osteoporose, aterosclerose e alteração no perfil lipídico – que contribuem para o desenvolvimento de síndrome metabólica (POLOTSKY & POLOTSKY, 2010).

Diversos estudos mostram associação entre tecido adiposo e menopausa na alteração do perfil lipídico. Essas alterações incluem elevados níveis de colesterol total e LDL e diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (CARR, 2003). Aliado a isto, o tecido adiposo produz ácidos graxos livres que, no fígado, contribuem com a produção de lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e triglicérides. O aumento de ácidos graxos livres leva ao aumento da atividade da enzima lipase hepática, com subsequente aumento na produção de LDL e menor de HDL. Os ácidos graxos livres também contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina, principalmente no músculo, mediante a redução da translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana (WAJCHENBERG, 2000).

A preocupação pelo aumento da massa adiposa decorrente da menopausa se justifica pelo fato que pesquisas recentes têm mostrado uma nova linha de entendimento sobre a função do tecido adiposo. Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo não é apenas um fornecedor de energia e sim um órgão dinâmico capaz de produzir substâncias que são relacionadas com equilíbrio/homeostase corporal. Estas substâncias, produzidas pelos adipócitos, são conhecidas como adipocinas e possuem inúmeras funções, que incluem regulação da saciedade, metabolismo de lipídeos e carboidratos, além de estarem relacionadas com a sensibilidade à insulina (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

Existem diversas adipocinas (citocinas [fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6, angiotensinogênio...], leptina, Adiponectina, entre outras). Estas citocinas podem induzir a resistência à insulina, além de desempenhar papel importante na patogênese de disfunções endoteliais e subsequentemente a aterosclerose (AHIMA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2015).

Existe forte correlação entre TNF- α e a via de sinalização da insulina. O TNF- α ativa proteínas inflamatórias conhecidas como c-Jun-n-Terminal quinase (JNK) e proteína quinase inibidora do I κ B (IKK), induzindo a fosforilação em serina do receptor de insulina (IRS) e, assim, inibindo a via de sinalização da insulina, causando a resistência a este hormônio (ARNER, 1995; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Outras adipocinas são capazes de contribuir com a resistência à insulina,

como a interleucina-6 (IL-6) e o inibidor do ativador de plasminogênio1 (PAI-1) (CARVALHO *et al.*, 2006).

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana conhecido como receptor de insulina. Este receptor é composto de duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrana. A insulina liga-se à subunidade α do receptor, provocando uma mudança conformacional na subunidade β , que leva a sua autofosforilação em tirosina e ativa sua capacidade tirosina-quinase. Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles a proteína semelhante ao colágeno com homologia (Src), a janus quinase (JAK), a proteína quinase mitogênica ativada (MAPK) e a fosfatidilinositol-3-quinase (Pi3K). Essas proteínas, uma vez fosforiladas, recrutam e ativam diversos fatores intracelulares, com diversas funções celulares diferentes e estão relacionadas com o controle do crescimento, a regulação da mitogênese e as ações metabólicas da insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996; TAWFIK *et al.*, 2015) .

Por outro lado, algumas adipocinas contribuem com metabolismo da glicose, como a visfatina, que possui efeitos metabólicos semelhantes à insulina (ARNER, 2006), e a proteína estimuladora da acilação (ASP), que está envolvida na ativação do transporte de glicose, no aumento da reesterificação de ácidos graxos e na inibição da lipólise (GUIMARÃES *et al.*, 2007). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina, a oxidação de ácido graxo, a captação e a utilização da glicose no tecido adiposo e no músculo esquelético e a redução da expressão de TNF- α (CAMARA *et al.*, 2014). A leptina é responsável por regular a ingestão alimentar e o balanço energético corporal, sendo, assim, capaz de interferir no metabolismo da glicose e dos lipídeos (DONATO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007).

A insulina é um importante regulador da função ovariana e, com certeza, a resistência a este hormônio interfere com esta regulação, como observado em mulheres com diabetes tipo 2 e com síndrome do ovário policístico (PORETSKY *et al.*, 1999). Diante disso, o estrógeno tem função na manutenção da sensibilidade à insulina, por reduzir o hiperandrogenismo e melhorar a homeostase glicêmica. Porém, no estudo de Whitcrof *et al.* (2011), usando o tratamento com estrogênio em

mulheres na menopausa, mostraram não produzir efeitos benéficos no controle da resistência à insulina em grande parte dos pacientes – muitos dos quais não responderam à suplementação com tal hormônio por longo tempo e sim por um período curto e, após este período, alguns pacientes apresentaram efeitos colaterais. Diante disso, os pesquisadores levantaram a hipótese que a resistência à insulina não só tem impacto negativo sobre a produção de estrogênio, como também pode inibir a eficiência da sua suplementação.

Após a menopausa, a sensibilidade à insulina diminui, predispondo ao aparecimento da intolerância à glicose e do diabetes tipo 2 (STONEY *et al.*, 2001). Além do aumento da resistência à insulina, os níveis de pressão arterial também costumam se elevar. Assim, alguns autores sugerem que a elevação da pressão arterial pode estar relacionada à presença da resistência à insulina e da hiperinsulinemia compensatória (POEHLMAN *et al.*, 1997).

Dessa forma, a maior prevalência de resistência à insulina, as alterações cardiovasculares e inflamatórias e o aumento da gordura corporal, observados nesse período da vida, especialmente após a menopausa, sugerem associação entre esses fenômenos. Por conta disso, a investigação das respostas fisiológicas a estes fenômenos pode contribuir para o esclarecimento dessas relações.

A deficiência de estrógeno, as alterações do perfil lipídico, o ganho de peso/acúmulo de gordura corporal, a produção de adipocinas e o sedentarismo são considerados os principais fatores para a maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis em mulheres na menopausa.

Na tentativa de reduzir os efeitos deletérios da ausência do estrógeno, diversas abordagens têm sido empregadas. Uma delas é a terapia de reposição hormonal, que é uma intervenção farmacológica para o tratamento dos efeitos deletérios da menopausa. Porém, há trabalhos correlacionando essa intervenção com o aumento na incidência de alguns tipos de cânceres (mama e útero). Diante disso, verifica-se que as dosagens hormonais utilizadas ainda precisam ser mais investigadas quanto a seus efeitos (STEFANICK *et al.*, 2006; OLSON *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos mostram que, nesse momento, a mudança de estilo de vida parece ser a melhor estratégia para o controle dos fatores

de risco das mulheres menopausadas (KULLER *et al.*, 2001; WILDMAN *et al.*, 2004; WITCROFT & HERRIOT, 2011).

Neste sentido, estratégias nutricionais, como a restrição calórica (RC) – que é a redução do consumo de calorias em torno de 20 a 40% do *ad libitum* e adequada em nutrientes – tem sido indicada como excelente medida de redução de risco para doenças relacionadas à idade (PUG *et al.*, 1999; GENARO, 2009; TREPONOWSKI *et al.*, 2011). A RC está relacionada à redução do tecido adiposo, podendo favorecer a modulação dos peptídeos derivados da gordura, incluindo a redução da concentração de TNF- α e IL-6 e o aumento de adiponectina, o que resulta em aumento da sensibilidade à insulina, melhor remodelação óssea e redução do risco de inflamações crônicas (GENARO, 2009; JIANPING & KELLER, 2010).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos da RC ainda não estão claros na literatura. Especula-se que as alterações metabólicas induzidas pela a RC, como a inibição da deposição de gordura no tecido adiposo e não adiposo, sejam devidas à influência na transdução de proteínas envolvidas em vias de sinalização celulares (XIANG & HE, 2011).

Em estudo de Lee *et al.* (2010), em que avaliou os níveis sanguíneos de adipocinas pró-inflamatórias de coreanas após a redução de peso, utilizando a RC, verificou-se redução significativa de TNF- α e leptina, acompanhada por aumento de adiponectina. Nesse sentido, uma pesquisa conduzida por Agueda *et al.* (2012) mostrou redução do peso e da gordura corporal, aumento da concentração de visfatina sanguínea e melhora na sensibilidade à insulina em mulheres com IMC 30-39 Kg/m² após 12 semanas de restrição calórica.

Recentemente, um estudo de Prasannarong *et al.* (2012), em que ratas ovariectomizadas foram submetidas a 12 semanas de restrição calórica (restrição de 35% do consumo habitual), demonstrou redução de peso, de concentração de insulina e de glicose quando comparadas com ratas OVX sem RC. Diante deste resultado, os autores concluíram que a RC pode impedir o desenvolvimento da resistência à insulina.

Em função das evidências do benefício da RC sobre a redução da gordura corporal e as alterações na secreção de hormônios produzidos pelo tecido adiposo,

sugere-se que esta estratégia nutricional, se adotada durante a menopausa, possa atenuar os efeitos deletérios desencadeados neste período.

Por outro lado, estudos mostram que a perda de peso promovida pela restrição calórica está associada com o catabolismo da massa muscular. Dessa forma, medidas preventivas devem ser adotadas para minimizar essas alterações. Evidências mostram que pessoas fisicamente ativas possuem maior longevidade e menor taxa de mortalidade e morbidade. Também há menor risco de desenvolver síndrome metabólica, aterosclerose, osteoporose, cardiomiopatias, câncer, diabetes, além de doenças autoimunes, neurodegenerativas e respiratórias, entre outras (PEDROSA *et al.*, 2004a; PEDROSA *et al.*, 2004b; TORRES-LEAL *et al.*, 2009; DiPIETRO, 2010).

Nesse contexto, um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que mulheres obesas ($IMC > 30 \text{Kg/m}^2$), submetidas a programa de exercício físico por 12 semanas, apresentaram menor circunferência de cintura e quadril, menores níveis sanguíneos de glicose e LDL e maior concentração de HDL. Estes resultados demonstram que o exercício físico é uma importante estratégia para reduzir fatores de risco para desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis em mulheres obesas (ROCHA *et al.*, 2008).

Outros estudos, conduzidos em nosso laboratório com animais, mostraram que a restrição calórica (associada à prática de exercício físico) reduz o peso corporal e a gordura corporal (PEDROSA *et al.*, 2004b; SANTOS *et al.*, 2011). Recentemente, Pedroso *et al.*, (2014) mostraram que animais destreinados com RC apresentam menor peso e gordura corporal, comparados com o controle, e melhora na tolerância à glicose.

Dentre os diversos tipos de exercício físicos, o treinamento resistido (TR) vem se destacando por promover alterações na composição corporal, como redução de gordura e aumento de massa magra, redução de indicadores de doenças crônicas não transmissíveis e melhora na qualidade de vida de pessoas idosas (LEITE *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2012).

De acordo com isto, em um estudo de Leite *et al.* (2009), observou-se que o treinamento resistido por doze semanas reduziu o conteúdo de gordura no fígado,

no músculo e nos depósitos de gordura corporal (mesentérico e retroperitoneal) e melhorou o perfil lipídico em ratas ovariectomizadas. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa mostrou que o treinamento resistido é capaz de melhorar a expressão gênica de fatores envolvidos no metabolismo de gordura hepática e reduzir o estoque de gordura (mesentérico e retroperitoneal) em ratas OVX treinadas comparadas com as ratas OVX sedentárias (DOMINGOS *et al.*, 2012).

No estudo de Shiguemoto *et al.* (2012) demonstraram que 12 semanas de treinamento resistido são eficientes em reverter os efeitos deletérios causados pela ovariectomia no tecido ósseo. Em outra pesquisa, o treinamento resistido manteve a densidade mineral óssea e melhorou a força muscular de mulheres idosas/pós-menopausa, mostrando que esta intervenção é importante para prevenir a perda da densidade óssea que ocorre com a menopausa ou com o envelhecimento (RYAN *et al.*, 1998).

Nota-se que a prática de exercício físico, assim como a restrição calórica, são ótimas estratégias para melhorar a qualidade de vida. No entanto, existem poucas evidências da associação entre restrição calórica e treinamento físico nessa fase da vida da mulher. De acordo com isto, a iniciativa *The Women's Healthy Lifestyle Project* (WHLP) (2001) mostrou que alterações no estilo de vida, como baixo consumo de ácidos graxos saturados, colesterol e prática de exercício físico, reduzem os níveis de colesterol, triglicérides e peso decorrentes da menopausa. Dando sequência aquele projeto, WILDMAN *et al.*, (2004) mostraram que a intervenção dietética com a prática de exercício físico reduz a aterosclerose em mulheres menopausadas.

O estudo de Imayama e colaboradores (2012) mostrou que a combinação entre restrição calórica e exercício aeróbico reduziu os níveis da proteína C reativa, IL-6 e circunferência da cintura e melhorou a glicemia em mulheres menopausadas. Os autores relatam que a restrição calórica com ou sem exercício reduziu os biomarcadores inflamatórios nestas mulheres e contribuiu com a redução de risco de câncer.

Os estudos citados são referentes à prática de exercício aeróbico, pois, de fato, existem poucas pesquisas associando a restrição calórica e o treinamento resistido em mulheres menopausadas.

Neste contexto, García-Unciti *et al.* (2012) mostraram que o treinamento resistido (70%-80%) associado à restrição calórica (-500Kcal/dia) por 16 semanas foi eficaz em reduzir o peso e melhorar a sensibilidade à insulina de mulheres em diferentes fases da menopausa. Outros estudos já mostraram que a associação entre a restrição calórica e o treinamento resistido reduz o peso corporal, melhora o perfil lipídico e reduz a pressão arterial em mulheres menopausadas (MESSIER *et al.*, 2010; SÉNÉCHAL *et al.*, 2012).

Recentemente, St-Onge *et al.* (2013) mostraram que a combinação do treinamento resistido com a restrição calórica não foi capaz de alterar o gasto energético de mulheres na pós-menopausa. Assim, nota-se que existem poucas evidências entre a prática de treinamento resistido associado à restrição calórica em mulheres nesta fase da vida. Contudo, é importante estudar as alterações decorrentes destas intervenções na melhora da qualidade de vida de mulheres na pós-menopausa.

A hipótese desta pesquisa é baseada nas evidências que apontam que a restrição calórica e a prática de exercício físico reduzem a gordura corporal, consequentemente, melhoram o quadro inflamatório e diminuem o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis. Porém, até o presente momento não tenho ciência de estudos que verificaram a associação da restrição calórica e do treinamento físico resistido em interferir nos mecanismos celulares subjacentes à resistência à insulina, na composição corporal e em indicadores inflamatórios de ratas submetidas à menopausa induzida.

Esta pesquisa faz parte de um trabalho em parceria com o Departamento de Fisiologia do Exercício, da Faculdade de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que investiga o efeito da restrição calórica e do treinamento resistido sobre diversas variáveis, além das incluídas nesse projeto, sendo elas: cardiovasculares e metabólicas, relação entre obesidade óssea e osteoporose, características musculares e da biogênese mitocondrial.

Em súmula, o projeto objetiva analisar alguns dos mecanismos que estão envolvidos na resistência à insulina ocasionado pela indução da menopausa e verificar se a combinação da restrição calórica com o treinamento resistido pode melhorar este quadro.

2 JUSTIFICATIVA

A menopausa está associada com distúrbios fisiológicos, tais como: aumento da massa corporal, redução na sensibilidade à insulina e alterações na distribuição da gordura corporal, tanto na gordura visceral quanto na subcutânea. Estas distúrbios estão relacionadas às alterações da taxa de andrógenos e estrógenos que provocam o aumento na deposição de gordura corporal. Sabe-se que o aumento da gordura corporal media a resistência à insulina, osteoporose e alteração no perfil lipídico que contribui para a síndrome metabólica (POLOTSKY & POLOTSKY, 2010). Estas alterações ocorrem tanto em humano como em roedores (ESCRIVA *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 2012). A ovariectomia tem sido usada em modelo animal para simular a menopausa humana (SAENGSIKISUWAN *et al.*, 2009; WOZNIAK *et al.*, 2009).

A resistência à insulina é um processo multifatorial, o qual ainda não é totalmente esclarecido. Porém, alguns autores relatam que o envelhecimento, associado à redução da produção hormonal e ao ganho de gordura corporal, leva à resistência à insulina tanto em humanos como em ratos (VIEIRA *et al.*, 2012). A sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, conhecido como receptor de insulina. Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles a Pi3K. Essa proteína, uma vez fosforilada, recruta e ativa diversos fatores intracelulares, como a via da proteína quinase B (AKT). A Akt é importante para o metabolismo de glicose e lipídios no tecido adiposo (SARGIS *et al.*, 2012).

Estudos mostram que, nesse momento, a mudança de estilo de vida parece ser a melhor estratégia para o controle dos fatores de risco das mulheres menopausadas (KULLER *et al.*, 2001; WILDMAN *et al.*, 2004; WHITCROFT *et al.*, 2011). Neste sentido, estratégias nutricionais, como a restrição calórica (RC) – que é a redução do consumo de calorias em torno de 20 a 40% do *ad libitum* e adequada em nutrientes, tem sido indicada como excelente medida de redução de risco para doenças relacionadas à menopausa PUG *et al.*, 1999; TREPANOWSKI *et al.*, 2011).

Além disso, evidências mostram que pessoas fisicamente ativas possuem maior longevidade e menor taxa de mortalidade e morbidade; também têm menor risco de desenvolver síndrome metabólica, aterosclerose, osteoporose, cardiomiopatias, câncer, diabetes, doenças autoimunes, neurodegenerativas e respiratórias, entre outras (PEDROSA *et al.*, 2004; DiPIETRO, 2010).

Assim, o objetivo do estudo é analisar alguns dos mecanismos que estão envolvidos na resistência à insulina ocasionada pela indução da menopausa e verificar se a combinação da restrição calórica (30%) com o treinamento resistido pode melhorar a glicemia, insulinemia, resistência à insulina e a hipoadinopectina de ratas ovariectomizadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar os efeitos isolados e associados da restrição calórica e do treinamento resistido sobre a sensibilidade à insulina em ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da ovariectomia sobre a resistência à insulina.

Avaliar e comparar os efeitos isolados e associados da restrição calórica e do treinamento resistido sobre a sensibilidade à insulina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 80 ratas fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem *Holtzman*, com idade de quatorze semanas e pesando (em média) 274,1 g, provenientes do Biotério da Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus de Araraquara (SP). Os procedimentos foram realizados no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram mantidos 1 por caixa com maravalhas, sob condição padronizada de iluminação com luz acesa às 20 horas (ciclo invertido escuro/claro ou 12 horas), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$, com 15 a 20 trocas de ar por hora.

Durante todo o período de adaptação, os animais tiveram livre acesso à água e à ração. Após o período de adaptação, os animais com restrição calórica receberam 70% da ingestão de ração medida previamente (no período de adaptação). A manipulação dos animais ocorreu em horário fixo, com início entre 11:00 e 11:30 horas e término entre 16:00 e 16:30 horas. Neste horário, ocorrem o fornecimento e a pesagem da ração, a troca da água dos bebedouros, a limpeza das caixas, a troca das maravalhas e o treinamento resistido. A pesagem das ratas, duas vezes por semana (segunda-feira e sexta-feira), foi feita em uma balança com precisão de 0,1g (GEHARA). Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, conforme protocolo 004/13.

4.1.1 Grupos e desenho experimentais

A amostra foi constituída de 80 ratas. Sendo que 60 ratas chegaram no mês de abril e as outras 20 chegaram no mês de maio ao biotério. Todos os animais

chegaram ao biotério com quatro semanas de idade e ficaram em adaptação por dez semanas – até completarem quatorze semanas de idade para realização da cirurgia. No período de adaptação, as ratas ficaram em caixas com maravalhas e tiveram livre acesso à água e à ração. Após o período de adaptação, as 60 primeiras ratas a chegarem ao biotério foram distribuídas em 8 grupos experimentais (Figura 1).

a) Grupo Sham (Sham) (n = 10), composto por animais que não tiveram extraídos os ovários, não fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

b) Grupo Sham Restrição Calórica (Sham RC) (n = 10), composto por animais que não tiveram extraídos os ovários, não fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

c) Grupo Sham Treinado Restrição Calórica (Sham TR+RC) (n=10), composto por animais que não tiveram extraídos os ovários, fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

d) Grupo Sham Treinado (Sham TR) (n = 10), composto por animais que não tiveram extraídos os ovários, fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

e) Grupo Ovariectomia Sedentário (OVX) (n = 10), composto por animais que não fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

f) Grupo Ovariectomia Sedentário restrição calórica (OVX RC) (n = 10), composto por animais que não fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

g) Grupo Ovariectomia Treinado (OVX TR) (n = 10), composto por animais que fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

h) Grupo Ovariectomizado Treinado Restrição Calórica (OVX TR + CR) (n= 10), composto por animais que fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

Figura 1: Esquema de distribuição das ratas e desenho experimental

Quando as ratas completaram quatorze semanas de idades, foi realizada a cirurgia e, após dois dias de cirurgia, iniciou-se o consumo alimentar, a fim de estipular a média de consumo por animal para, posteriormente, iniciar a restrição calórica em 30%. O monitoramento do consumo alimentar foi oito dias antes de iniciar a restrição. Para a avaliação do consumo da ração, foi calculada a diferença entre a quantidade de ração oferecida e a restante, através de pesagem, utilizando uma balança com precisão de 0,01g (GEHARA).

Após, dez dias da cirurgia, ocorreram duas sessões de familiarização do treino e, depois, o teste de carga máxima. Em seguida, iniciaram-se o treinamento e a restrição calórica (Figura 2).

Figura 3: Delineamento experimental

4.1.2 Ração

As rações utilizadas no presente estudo foram preparadas na sala de ração do Instituto de Química e de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (IQ/FCF-USP), as dietas seguiram as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN - 93M) (REEVES *et al.*, 1993).

4.1.3 Ração Restrição Calórica

Para garantir que a ingestão de nutrientes dos animais submetidos à restrição calórica seja compatível com aquelas que foram alimentados *ad libitum*, os grupos SHAM RC, SHAM TR+RC, OVC RC e OVX TR+RC tiveram sua ração modificada. Inicialmente, foram calculados o valor calórico bem como a quantidade de nutrientes constituídos em 100g de ração AIN-93M. Em seguida, foram retirados 27g de amido, a fim de proporcionar a restrição energética. Na sequência, a concentração dos demais nutrientes foi aumentada proporcionalmente, propiciando que este grupo

consumisse a quantidade recomendada pelo American Institute of Nutrition e, assim, evitar a instalação de algum tipo de deficiência nutricional não intencional (PUGH *et al.*, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das rações utilizadas no experimento (AIN-93M Modificada) (REEVES *et al.*, 1993).

Ingredientes	Ração AIN-93M	Ração Restrição Calórica	Ração Controle	Ração Restrição Calórica
	g/Kg	g/Kg	100g	70g
Amido	620,692	501,14	62,07	35,08
Sacarose	100,000	100,000	10,00	7,00
Celulose	50,000	71,430	5,00	5,00
Caseína	140,000	200,000	14,00	14,00
L-cistina	1,800	2,430	0,18	0,17
Óleo de soja	40,000	57,140	4,00	4,00
Mistura de minerais	35,000	50,000	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	10,000	14,290	1,00	1,00
Bitartarato de colina	2,500	3,570	0,25	0,25
Tetrabutyl-hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
Total	1.000g	1.000g	100g	70g

4.2 Protocolo de treinamento resistido

O protocolo de treinamento resistido foi adaptado de Hornerberg & Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.

Inicialmente, as ratas foram familiarizadas ao protocolo de treinamento resistido, que exige que os animais escalem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2cm, com inclinação de 80°) com o aparato de carga sem peso preso à cauda. O tamanho da escada induz os animais a realizarem 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. Com o aparato fixado à cauda, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário, um estímulo

foi aplicado na cauda do animal, para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada, as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante dois minutos (Figura 4). Este procedimento foi repetido até que os animais conseguiram voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo. Três dias após a familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4 a 8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A primeira escalada consistiu em carregar carga de 75% da massa corporal do animal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de peso de 30g. Este acréscimo de carga (+ 30g) foi repetido consecutivamente em cada escalada até carga com a qual a rata não conseguiu escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguisse progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata.

Figura 5: Protocolo de treinamento resistido em escada, adaptado de Homberger e Farrar (2004).

As sessões de treinamento consistiam de quatro escaladas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes, foram adicionados 30g até que nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada, com total máximo de nove escaladas (Figura 6). Esta padronização de sessões de treinamento foi realizada durante doze semanas, totalizando vinte e nove sessões de treinamento resistido com intervalo de 72 horas entre uma sessão e outra.

Figura 7: Organização da carga de carregamento por sessão de treino.

4.2.1 Volume total de carga de carregamento

Para o cálculo do volume total de carga de carregamento semanal, foi somada a carga de cada escalada que o animal realizava até a exaustão de cada sessão na semana.

Volume total de carga de carregamento (Kg) = (semana 1/sessão 1 (carga escalada 1 + carga escalada 2...+carga da última escalada) + sessão 2 (carga escalada 1 + carga escalada 2 ... + carga última escalada)... + última sessão (carga escalada 1 + carga escalada 2...+ carga última escalada).

4.3 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina

Para a determinação da curva glicêmica após administração de insulina, foi injetada intraperitonealmente uma dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (Humulin® R, Eli Lilly and Company®, Indianópolis, Indiana, EUA) nos animais em jejum de 12 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®) em amostras de sangue retiradas da veia caudal, nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (Kitt), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows), de acordo com o método proposto por Bonora *et al.* (1989). Este teste foi realizado no início (semana 1), no meio (semana 8) e no final (semana 12) do protocolo experimental.

4.4 Cirurgia de Ovariectomia

Inicialmente, as ratas foram anestesiadas com associação de 13mg/Kg de xilazina (Rompum- Bayer – São Paulo, SP, Brasil) e 33mg/Kg de cetamina base (Francotar- Virbac - Roseira, SP, Brasil), por administração intraperitoneal (via intramuscular). Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia da região a ser operada, ou seja, no local da incisão, com posterior assepsia da pele, através do uso de rifamicina SV sódica (rifocina spray - Lab, Sanofi), sendo este procedimento de assepsia realizado após o término da sutura. Durante todos os procedimentos da

ovariectomia, as ratas foram mantidas sob o efeito anestésico proporcionado pela associação xilazina-ketamina. Primeiramente, foi realizada uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm), através da pele e da camada muscular, com uma lâmina de bisturi aço carbono nº 15 (EMBRAMAC), região que se localiza entre a última costela e a coxa, em paralelo com a linha corporal do animal. A cavidade peritoneal foi aberta e feita uma ligadura abaixo da fímbria. Os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e nos músculos foi suturada com fio cirúrgico de seda trançada tamanho 4-0, esterilizado e agulhado (1,7cm x ½ circ0), marca Needle Line. A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol, 20mg/kg por via subcutânea. Foi respeitado período de uma semana de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido.

A sham operação foi realizada por meio dos mesmos procedimentos da ovariectomia, com exposição e devolução dos ovários ao local de origem. Durante a recuperação anestésica, os animais foram observados por cerca de quatro horas.

Os procedimentos cirúrgicos e anestésicos foram acompanhados pelo Médico-veterinário Dr. Thiago Francisco de Moraes (CRMV – SP 24016).

4.5 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos

Em média, Em média, os animais foram mantidos em jejum de 4 e 48h após a última sessão de treino, variando conforme o horário no qual o animal seria eutanasiado. A ração foi removida por volta das 4:00 e 10:00 horas da manhã e a eutanásia ocorreu nos períodos da manhã (8:00 horas) e da tarde (14:00 horas), durante sete dias consecutivos, sendo eutanasiados cinco animais no período da manhã e cinco animais no período da tarde.

Os animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Eles receberam anestesia cinco minutos antes da decapitação, para amenizar-lhes qualquer forma de sofrimento e/ou estresse. O coquetel anestésico (4,5/4,5/1,8/7,2 u/v) foi composto por: cloridrato de xilazina (20mg/ml), cloridrato de cetamina (100mg/ml), acepromazina (20mg/dl) e água destilada. Após a

decapitação, o sangue do tronco foi coletado em dois tubos distintos e identificados com o número de cada animal, os quais não possuíam nenhum anticoagulante, visando obtenção da porção sérica do sangue. A cada cinco animais eutanasiados, as amostras foram centrifugadas (jouan BR4i) a 3.000 rotações/minuto, por 15 minutos, a 4°C. Entre um animal e outro, os tubos para obtenção do soro foram mantidos em temperatura ambiente até a centrifugação. Depois de centrifugados, os tubos foram mantidos em geladeiras até o final da eutanásia, quando foi, então, separada a porção sérica de cada tubo. As amostras de soro foram devidamente armazenadas em microtubos do tipo eppendorf, identificados com o número de cada animal. Tomou-se o cuidado de se colocar em cada microtubo a quantidade necessária apenas para uma única análise, para evitar que a amostra fosse descongelada e congelada várias vezes.

Logo após a coleta de sangue, os músculos gastrocnêmio e sóleo, de ambas as patas, além de fígado, tecido adiposo, coração, rim e osso, foram rápida e cuidadosamente dissecados e coletados. Todos os tecidos citados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g (Ohaus), colocados individualmente em saquinhos plásticos e congelados em nitrogênio líquido. Alguns órgãos, como intestino e baço, foram pesados e devolvidos à carcaça.

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrointestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça. A carcaça foi, então, pesada em balança analítica com precisão de 0,01g (Marte AL 5000).

As amostras de soro e tecidos foram armazenadas em freezer a -80°C. A carcaça foi armazenada em freezer a -20°C até a determinação da composição corporal.

4.6 Parâmetros séricos

Todos os parâmetros séricos foram analisados em duplicatas. A média da duplicata representou o valor de cada animal. Foi utilizado *kit* de ELISA para a

determinação de adiponectina (Rat adiponectin/ Millipore). A insulina foi analisada por multiplex immunoassay through LINCOpex kits and automated Lincopex 200 equipment (LINCO Research).

4.7 Parâmetros biomoleculares

Quantificação das proteínas Pi3K, Akt, pAKT 308 e GLUT 4 no tecido adiposo subcutâneo e retroperitoneal.

4.7.1 Western blotting

4.7.2 Extração de Proteína

Após a dissecação dos tecidos, foram separados 300 a 400 mg das amostras, as quais foram pulverizadas em nitrogênio líquido por cerca de 10 segundos. Posteriormente, foram mantidos em microtubos até a extração.

Os tecidos foram, então, homogeneizado em 1,2 mL de tampão para lise e extração das proteínas contendo 20 mM Tris HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM EDTA (pH 8,00), 10% glicerol, 20 mM fluoreto de sódio, 30 mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio e água ultrapura. O tampão foi sempre mantido no gelo e, no momento do uso, acrescentaram-se 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato de Na, 50 µM leupeptina e 5 µM aprotinina – todos os inibidores foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para a homogeneização, foi usado homogeneizador elétrico tipo polytron (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 *bursts* de cerca de 30 segundos cada. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper as células adiposas. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70% e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e temperatura de -4°C. Após a centrifugação, a amostra ficou separada em três camadas: *fat cake* (camada superior), proteínas extraídas (camada intermediária) e infranadante (camada inferior). A camada intermediária foi coletada delicadamente, com o auxílio de seringa e agulha, e transferida para outro tubo (1,5 mL). Foram feitas alíquotas de 50 µL, armazenadas em *freezer* (-80°C).

4.7.3 Preparo do gel de poliacrilamida

Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônia e 0,1% TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10%, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,077% TEMED.

4.7.4 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western blotting*

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras contendo 100 µg de proteína foram previamente aquecidas em banho-maria por cinco minutos, com o intuito de desnaturar as proteínas. Logo em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida, com ponteiros para gel (diâmetro da ponta 0,57 mm), balizado por marcador padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow* de 12.000 a 225.000 Da (Amersham GE Healthcare - RPN800E). A eletroforese foi realizada em cubas para gel (*Amersham GE Healthcare*), inicialmente a 60 V. Quando as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida.

4.7.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose) foi hidratada e, então, um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm (Whatman), gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 8,3), sob corrente de 25 V, por 90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1% ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15% $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5% Tween].

4.7.6 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5%, em tampão PBST, por 60 minutos, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi adquirido da *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA, USA). As proteínas foram diluídas em 15 mL de PBST a 2% do pó de agente bloqueador, proveniente do *kit ECL Advance*, que foi utilizado para a incubação das membranas *overnight*, sob agitação em geladeira a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST, e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em PBST, por 1h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com agitação.

4.7.7 Revelação com sistemas quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do *kit* ECL *Advance* (GE Healthcare), composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio, e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os *blots* foram visualizados pelo sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare), que capturou imagens por 7 minutos, e analisados pelo *software* Quantity One (Bio-Rad).

4.8 Análise estatística

Os resultados do projeto foram avaliados por meio de análise estatística, utilizando o teste ANOVA para a comparação entre os grupos e os contrastes foram obtidos pelo teste de *Tukey*. Em todas as análises, foi considerado valor de alfa de 0,05. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc).

5 CAPÍTULO 1/ARTIGO 1

Restrição calórica e treinamento resistido melhoram a concentração de adiponectina, mas não afetam marcadores de sensibilidade à insulina de ratas ovariectomizadas

Título curto: Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido na ovariectomia

Daiana Vianna¹, M.Sci.; Anderson Diogo de Souza Lino², M.Sci.; Marina Rodrigues Barbosa², M.Sci.; Leandro Dias Gonçalves Ruffoni², M.Sci.; Markus Vinícius de Souza², M.Sci.; Cecília Tardivo Marin²; Gilberto Eiji Shigemoto^{2†}, Ph.D.; Julio Tirapegui^{1†*}, Ph.D.

1 Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil

2 Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Contribuição dos autores:

D.V.; G.E.J. e J.T. formulação do projeto; D.V., A.D.S.L., M.R.B., L.D.G.R., M.V.S e C.T.M. conduziram a pesquisa; D.V., A.D.S.L e G.E.J. analisaram os dados; D.V. e J.T. escreveram o artigo; J.T. principal investigador, revisou os dados e o manuscrito.

Autor correspondente

Julio Tirapegui^{*}

Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil

Tel.: +55-11-3091-3309; fax: +55-11-3815-4410

E-mail address: tirapegu@usp.br

Revista Pretendidad para o envio do artigo: Nutriion. Fator de Impacto 3.046.

RESUMO:

Neste estudo, avaliamos o efeito da restrição calórica e do treinamento resistido na massa corporal e na sensibilidade à insulina de ratas ovariectomizadas. 80 ratas fêmeas da linhagem Holtzman foram distribuídas em 8 grupos (n=10 cada): ovariectomizado (OVX), ovariectomizado com restrição calórica (OVX RC), ovariectomizado com treinamento resistido (OVX TR), ovariectomizado com restrição calórica e treinamento resistido (OVX TR+RC), Sham operado (SHAM), Sham com restrição calórica (SHAM RC), sham com treinamento resistido (SHAM TR), sham com restrição calórica e treinamento resistido (SHAM TR+RC). Após 13 semanas de intervenção, foram analisados: massa corporal, gordura corporal; concentrações sanguíneas de glicose, insulina e adiponectina; conteúdo de AKT total e fosforilada, pi3k e Glut 4 (nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal). As ratas ovariectomizadas (OVX, OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC) apresentaram maior massa corporal e gordura corporal quando comparadas ao grupo SHAM. As concentrações de glicose e insulina foram semelhantes em todos os grupos experimentais, porém a concentração de adiponectina foi menor nos grupos ovariectomizados (OVX, OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC), quando comparados ao grupo SHAM. A RC e o TR aumentaram a concentração de adiponectina quando comparado ao grupo OVX. Não houve diferença entre os grupos em relação à via de sinalização da insulina nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal. Concluimos que a ovariectomia causa aumento de massa e gordura corporal, levando à menor concentração de adiponectina, e que a RC e o TR alteram estas modificações.

Palavras-chave: Menopausa. Resistência à insulina. Restrição Calórica. Treinamento resistido. Adiponectina.

Introdução

A menopausa está associada com desordens fisiológicas, tais como: aumento da massa corporal, redução na sensibilidade à insulina e alterações na distribuição da gordura corporal, tanto na gordura visceral quanto na subcutânea. Estas desordens estão relacionadas às alterações da taxa de andrógenos e estrógenos que provocam o aumento na deposição de gordura corporal. Sabe-se que o aumento da gordura corporal media a resistência à insulina, osteoporose e alteração no perfil lipídico que contribui para a síndrome metabólica [1]. Estas alterações ocorrem tanto em humano como em roedores [2,3]. A ovariectomia (OVX) tem sido usada em modelo animal para simular a menopausa humana [3,4].

A preocupação quanto ao aumento da massa adiposa decorrente da menopausa se justifica pelo fato que pesquisas recentes têm mostrado uma nova linha de entendimento sobre a função do tecido adiposo. Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo não é apenas um fornecedor de energia e sim um órgão dinâmico, capaz de produzir substâncias que são relacionadas com equilíbrio/homeostase corporal. Estas substâncias, produzidas pelos adipócitos, são conhecidas como adipocinas [5,6]. As adipocinas (por exemplo, a adiponectina) aumentam a sensibilidade à insulina, a oxidação de ácido graxo, a captação e a utilização da glicose no tecido adiposo e no músculo esquelético. Concentrações sanguíneas baixas de adiponectina estão associadas com obesidade, doenças cardiovasculares, resistência à insulina e doença hepática gordurosa não alcoólica [6,7].

A resistência à insulina é um processo multifatorial, o qual ainda não é totalmente esclarecido. Porém, alguns autores relatam que o envelhecimento, associado à redução da produção hormonal e ao ganho de gordura corporal, leva à resistência à insulina tanto em humanos como em ratos [3]. O tecido adiposo tem a função de regular o balanço energético: em excesso de calorias, armazena, e, na falta delas, mobiliza seus estoques para gerar energia. Esta regulação é feita por ação de hormônios como a insulina e as catecolaminas. A sinalização intracelular da insulina no tecido adiposo começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, conhecido como receptor de insulina (IRS). Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles a

fosfatidilinositol 3 quinase (Pi3K). Essa proteína, uma vez fosforilada, recruta e ativa diversos fatores intracelulares, como a via da proteína quinase B (AKT). A Akt é importante para o metabolismo de glicose e lipídios no tecido adiposo [8].

Estudos mostram que, nesse momento, a mudança de estilo de vida parece ser a melhor estratégia para o controle dos fatores de risco das mulheres menopausadas [9,10,11]. Neste sentido, estratégias nutricionais, como a restrição calórica (RC) – que é a redução do consumo de calorias em torno de 20 a 40% do *ad libitum* e adequada em nutrientes, tem sido indicada como excelente medida de redução de risco para doenças relacionadas à menopausa [12,13].

Além disso, evidências mostram que pessoas fisicamente ativas possuem maior longevidade e menor taxa de mortalidade e morbidade; também têm menor risco de desenvolver síndrome metabólica, aterosclerose, osteoporose, cardiomiopatias, câncer, diabetes, doenças autoimunes, neurodegenerativas e respiratórias, entre outras [14,15].

Assim, o objetivo do estudo é analisar alguns dos mecanismos que estão envolvidos na resistência à insulina ocasionada pela indução da menopausa e verificar se a combinação da restrição calórica (30%) com o treinamento resistido pode melhorar a glicemia, insulinemia, resistência à insulina e a hipoadinopectina de ratas ovariectomizadas.

MÉTODOS

Animais

As ratas fêmeas da linhagem Holtzman foram fornecidas pelo Biotério da Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus Araraquara-SP. Os procedimentos foram realizados no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram mantidos um por caixa com maravalhas, sob condição padronizada de iluminação, com luz acesa às 20 horas (ciclo invertido escuro/claro ou 12 horas), temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$, com 15 a 20 trocas de ar por hora. Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas

e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, protocolo número 004/13.

Dieta

As dietas foram preparadas em nosso laboratório, de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN-93M) [16]. As rações foram peletizadas. Os animais com restrição calórica receberam 70% da ingestão de ração medida previamente no período de adaptação. Utilizamos o consumo de alimentos aferido durante o período de adaptação, que foi de 4 semanas antes do início do experimento, como base para realizar a restrição calórica de 30% do consumo de alimentos habitual de cada rato. Além disso, a quantidade de alimento oferecido para os ratos dos grupos com restrição de calorias foi individualizada para cada animal em relação ao consumo anterior ao início do experimento. As dietas dos grupos com restrição calórica foram ajustadas, para evitar qualquer tipo de deficiência nutricional, aumentando proporcionalmente nutrientes para a restrição alimentar [12] e seguiram a mesma composição de prévio estudo do nosso grupo [17]. As composições das dietas estão na tabela 1.

Grupos e desenho experimental

A amostra foi constituída de 80 ratas. Todos os animais chegaram ao biotério com quatro semanas de idade e ficaram em adaptação por dez semanas – até completarem quatorze semanas de idade para submissão à cirurgia. No período de adaptação, as ratas ficaram em caixas com maravalhas e tiveram livre acesso à água e à ração. Após o período de adaptação, as 80 ratas foram distribuídas em 8 grupos experimentais (Figura1):

a) Grupo Sham (Sham) (n = 10), composto por animais que não tiveram os ovários extraídos, não fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

B) Grupo Sham Restrição Calórica (Sham RC) (n = 10), composto por animais que não tiveram os ovários extraídos, não fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

c) Grupo Sham Treinado Restrição Calórica (Sham TR+RC) (n=10), composto por animais que não tiveram os ovários extraídos, fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

d) Grupo Sham treinado (Sham TR) (n = 10), composto por animais que não tiveram os ovários extraídos, fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

e) Grupo Ovariectomia sedentário (OVX) (n = 10), composto por animais que não fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

f) Grupo Ovariectomia sedentário restrição calórica (OVX RC) (n = 10), composto por animais que não fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

g) Grupo Ovariectomia Treinado (OVX TR) (n = 10), composto por animais que fizeram treinamento resistido e receberam a ração controle.

h) Grupo Ovariectomizado Treinado Restrição calórica (OVX TR + CR) (n= 10), composto por animais que fizeram treinamento resistido e receberam a dieta restrita em calorias.

Protocolo de treinamento resistido

Durante 13 semanas, as ratas foram submetidas ao protocolo de treinamento resistido (*resistance training*), adaptado de Hornerberg & Farrar [18], que consistia em sessões de escaladas realizadas a cada 72h após a última sessão (*consisted of the climbing sessions were performed 72 hours after least session*). Inicialmente, as ratas foram adaptadas ao protocolo de treinamento resistido, que exige que os animais escalem uma escada vertical (1,1 X 0,8m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com aparato de carga sem peso preso à cauda. O tamanho da escada induz o animal a realizar 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso à porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. Com o aparato fixado à cauda, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário, um estímulo foi aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada, as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm), onde descansavam durante dois minutos.

Este procedimento foi repetido até que os animais conseguiram voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo. Três dias após a familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4 a 8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A primeira escalada consistiu em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Após 2 minutos de recuperação, a segunda escalada foi realizada com a adição de peso de 30g. Este acréscimo de carga (+ 30g) foi repetido consecutivamente em cada escalada, até uma carga com a qual a rata não conseguiu escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguisse progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata.

As sessões de treinamento consistiam de quatro escaladas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes, foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada, com total máximo de nove escaladas

Cirurgias: Ovariectomia e SHAM

Quando as ratas completaram 14 semanas de idades, foram submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou sham (SHAM). Resumidamente, as ratas foram anestesiadas com xilazina-Ketamina; em seguida, foi realizada uma pequena incisão bilateral. Nas ratas OVX, os ovários foram removidos e a incisão feita na pele e nos músculos foi suturada. Para o SHAM, foi feita a incisão na pele e no músculo, teve o ovário visualizado mas não removido e depois foi suturada. Como previamente citado por Domingos et al. [19]. A eficácia da ovariectomia foi determinado na conclusão do estudo via verificação de atrofia uterina significativa.

Eutanásia

O sacrifício aconteceu por decapitação, quatro horas após a remoção das rações. Foi realizada coleta sanguínea do tronco, a porção sérica foi removida e

mantida em freezer a -80°C. Os tecidos adiposos (subcutâneo e retroperitoneal) foram dissecados, pesados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posterior análise.

Análises bioquímicas

A determinação das concentrações de glicose sérica foi obtida por meio de *kit* comercial específico (LabTest). Foram utilizados *kits* de ELISA para a determinação de adiponectina (Rat adiponectin/Millipore). A insulina foi analisada por multiplex immunoassay through LINCoplex kits and automated Lincoplex 200 equipment (LINCO Research).

Teste de intolerância à insulina

Para o teste de insulina, foi dada injeção intraperitoneal, com uma dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (Humulin® R, Eli Lilly and Company®, Indianópolis, Indiana, EUA) nos animais em jejum de 12 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®) em amostras de sangue retiradas da veia caudal nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (Kitt), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows), de acordo com o método proposto por Bonora *et al.* [20].

Western blot

A amostra foi pesada, homogeneizada e centrifugada em tampão TRIS HCl 10mM; EDTA 1mM, sacarose 250mM, pH 7,4 obtendo-se fração total de membranas celulares. A concentração de proteína total foi detectada pelo método de Bradford. Quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio, durante uma hora, com 5% de albumina bovina sérica (BSA), as membranas foram incubadas

com anticorpo: AKT (Cell Signaling 1:1000);phospho AKT ^{tyr308} (Cell signaling 1:1000); PI3K (Cell signaling 1:1000) and GLUT 4 (Cell signaling 1:1.000). Posteriormente, foi feita incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho), marcado com enzima peroxidase (HRP) (sigma), diluído 1:1.000 em solução bloqueadora durante uma hora. Após lavagem em tampão, a membrana foi exposta à reação de ECL (Luminol 1,1%, Ácido P-Cumárico 0,48%, Tris 1M pH 8,5 11,1%, H₂O destilada) por dois minutos e posteriormente exposta ao Hyperfilm (IGF - Corporation, New Jersey, EUA) para detecção das bandas resultantes. Os *blots* foram revelados usando um *kit* para *wester blotting* de *quimioluminescência eletrogerada* (ECL, GE Healthcare). Os filmes foram quantificados pelo sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare), que capturou imagens por 7 minutos, e analisados pelo *software* Quantity One (Bio-Rad). As proteínas analisadas foram expressas em unidades arbitrárias.

Análise estatística

Os resultados do projeto foram avaliados por meio de análise estatística utilizando o teste ANOVA, para a comparação entre os grupos, e os contrastes foram obtidos pelo teste de *Tukey*. Em todas as análises, foi considerado valor de alfa de 0,05. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc).

Resultados

Características metabólicas basais

As características metabólicas basais das ratas dos vários grupos estão resumidas na Tabela 2. A ovariectomia aumentou a massa corporal das ratas ovariectomizadas (OVX, OVX RC e OVX TR), quando comparados ao grupo SHAM (OVX +25%, $p<0,001$, OVX RC +8%, $p<0,001$ e OVX TR +12%, $p<0,001$). Importante notar que a RC e o TR, tanto isolados quanto combinados, reduziram o ganho de massa corporal nas ratas ovariectomizadas ($p<0,05$). Associado a este aumento da massa corporal está o ganho de gordura corporal, que foi +138% entre o grupo OVX vs SHAM, +68% OVX RC vs SHAM, +55% OVX TR vs SHAM. As ratas

dos grupos OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC apresentaram menor ganho de massa gorda quando comparadas às do grupo OVX ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$), mostrando que as intervenções foram eficazes em reduzir o ganho de massa e gordura corporal.

O grupo OVX apresentou maior consumo alimentar comparado com o grupo SHAM ($p<0,05$). O grupo OVX RC teve menor consumo de ração do que os grupos OVX e OVX TR ($p<0,001$) e maior consumo em relação aos grupos OVX TR+RC e SHAM RC ($p<0,001$). O grupo OVX TR+RC consumiu menos ração que os grupos OVX, OVX RC, OVX TR e SHAM ($p<0,01$). As diferenças encontradas entre os grupos com restrição calórica são devidas ao fato de a restrição ter sido individualizada para cada rata dos grupos OVX RC, OVX TR+RC, SHAM RC e SHAM TR+RC.

A massa do útero foi menor nos animais ovariectomizados de todos os grupos (OVX, OVX RC, OVX TR e OVX TR+RC), quando comparados ao grupo SHAM ($p<0,0001$). Estes dados indicam que o procedimento cirúrgico foi eficaz para induzir a menopausa.

Os animais dos grupos treinados (OVX TR, OVX TR+RC, SHAM TR, SHAM TR+RC) não apresentaram diferença na carga máxima de carregamento.

Marcadores bioquímicos após 13 semanas de intervenções

Após 13 semanas de intervenções, nota-se que as concentrações de glicose e insulina foram similares entre todos os grupos experimentais. A concentração de adiponectina foi menor no grupo OVX quando comparado aos grupos OVX RC, OVX TR, OVX TR +RC ($p<0,05$) e SHAM ($p<0,001$). As intervenções propostas RC e TR foram eficazes em reverter este decaimento da adiponectina sanguínea nas ratas ovariectomizadas; porém, os valores continuaram abaixo das ratas dos grupos SHAM, dados mostrados na Tabela 3.

O teste de ITT mostrou que não houve diferença entre os grupos experimentais no tempo inicial. Porém, no tempo final, as ratas OVX apresentaram tolerância à insulina quando comparadas às do grupo SHAM ($p<0,05$). As ratas OVX

submetidas ao TR e ao TR+RC apresentaram melhor sensibilidade à insulina quando comparadas ao grupo OVX ($p<0,05$) (Tabela 3).

Via de sinalização da insulina nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal

A via de sinalização da insulina foi analisada nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal no final do período experimental. As proteínas Akt, pAkt (Tyr 308), PI3k e Glut 4 foram similares em ambos os grupos, tanto no tecido adiposo subcutâneo (figura 1) quanto no tecido adiposo retroperitoneal (figura 2).

DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou os efeitos isolado e associado da restrição calórica (30%) e do treinamento resistido em parâmetros teciduais, bioquímicos e metabólicos de ratas ovariectomizadas. A hipótese testada foi de que a restrição calórica e o treinamento resistido poderiam alterar favoravelmente a composição corporal, mediante a redução da gordura corporal, e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade à insulina.

Cabe ressaltar que os dados obtidos neste estudo apontam que os animais com ovariectomia apresentam sinais decorrentes da menopausa, pois, quando comparados com o grupo controle (grupo Sham), mostraram diferenças típicas deste período, como aumento da massa corporal e da gordura corporal e aumento no consumo de ração. A relação entre os esteroides ovarianos e o ganho de massa corporal foi postulada por vários autores [21,22]. O estrogênio é capaz de manter a distribuição da gordura corporal, participa do gasto calórico e do controle dos níveis séricos de leptina, inibindo a ingestão alimentar e, portanto, reduz a massa corporal. Assim, a deficiência na produção de estrogênio está relacionada ao menor gasto energético e à hiperfagia conseqüentemente aumento da massa corpora [23,24,25]. Em roedores, a ovariectomia simula o que ocorre na menopausa em humanos, por

reduzir a circulação de estrogênio, permitindo o estudo da obesidade, do metabolismo de lipídeos e da resistência à insulina [26].

Nossos dados estão condizentes com a literatura citada acima, haja visto que os animais ovariectomizados aumentaram de peso quando comparados aos do grupo Sham. É interessante destacar que os animais ovariectomizados submetidos às intervenções de treinamento resistido e restrição calórica, tanto isolados ou combinados, apresentaram menor massa corporal quando comparados aos do grupo ovariectomizado.

Diversas abordagens têm sido empregadas na tentativa de reduzir a gordura corporal, melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir a incidência de doenças associadas às complicações da menopausa. Diversas pesquisas mostram que mudanças no estilo de vida da mulher na menopausa, como a prática de atividade física regular, e alterações no hábito alimentar modificam a composição corporal e os parâmetros bioquímicos que comprometem sobremaneira a qualidade de vida dessa população [9,10,11]. Neste sentido, estratégias nutricionais, como a restrição calórica, têm sido indicadas, pois a RC previne ou atenua a expressão de genes associados ao envelhecimento [27,28] e, conseqüentemente, retarda o aparecimento de doenças relacionadas à idade [28,29]. Sabe-se que a RC é uma estratégia comprovada de prolongar a vida em animais de laboratório, principalmente roedores [30].

Estudos mostram que a redução no consumo de calorias (*decreased caloric intake*) ou o aumento no gasto energético afeta a composição corporal e os parâmetros metabólicos em humanos e roedores [31,32,33]. Porém, os efeitos desta intervenção não estejam bem estabelecidos no contexto da ovariectomia em modelos animais. Prasannarong e colaboradores [34] mostraram que a RC (35%) por 12 semanas reduziu a massa corporal e a gordura visceral de ratas ovariectomizadas. Pesquisas em mulheres na menopausa com RC também relatam redução de massa corporal e gordura corporal [35,36,37].

Muitos programas de emagrecimento utilizam a combinação entre restrição calórica e exercício físico. Nesse sentido, Imayama e colaboradores [38] avaliaram a restrição calórica (ideal para 10% de redução de peso) isolada e combinada com

exercício aeróbico (225 min/semana de atividade moderada) em mulheres pós-menopausa com sobrepeso ou obesas. Os autores mostraram que a combinação da RC com exercício aeróbico reduz a massa gorda e os marcadores inflamatórios, reduzindo, assim, o risco de desenvolver doenças associadas à menopausa – como o câncer.

Nossos resultados mostram que os animais OVX TR+RC reduziram a massa corporal e a gordura visceral de forma condizente com os dados da literatura. No estudo de Pighon e colaboradores[39], se relata que os animais OVX com restrição calórica de 26% e com treinamento resistido por 8 semanas tiveram menor ganho de massa corporal e gordura corporal quando comparados ao grupo OVX sedentário.

Alguns estudos mostraram que OVX leva à obesidade [40] por reduzir o receptor de estrogênio α [41] ou por promover a deficiência da aromatase [42], o que promove o aumento no número e no tamanho das células adiposas brancas, sem aumentar a ingestão. Este aumento no teor de gordura é observado não só no tecido adiposo branco, mas também no fígado [43], no coração e no músculo esquelético [44]. No entanto, os mecanismos subjacentes ao acúmulo de gordura nos órgãos por deficiência do estrogênio são desconhecidos.

É fato conhecido que o tecido adiposo tem várias funções, como armazenar energia e produzir citocinas [45]. Entre as citocinas produzidas, destaca-se a adiponectina. A adiponectina é um hormônio anti-inflamatório regulado negativamente na obesidade [46]. Este hormônio regula a sensibilidade à insulina e a homeostase da glicose [47]. Níveis plasmáticos baixos de adiponectinas estão relacionados com a obesidade, a resistência à insulina e as doenças coronarianas [48].

Mulheres apresentam maior concentração de adiponectina do que os homens, sugerindo que o estrogênio tem papel importante sobre a produção de adiponectina. Porém, relatos da literatura são controversos: há redução, aumento bem como nenhuma alteração nas concentrações da adiponectina sanguínea [49,50,51]. Estudos com ratas ovariectomizadas mostram redução na concentração de adiponectina sanguínea [26,52]. Nossos resultados estão de acordo com os citados acima. As ratas do grupo OVX reduziram a concentração de adiponectina quando comparadas às ratas do grupo SHAM ($p < 0,001$). Um achado interessante

neste estudo é que a RC e o TR, de forma isolada ou associados (TR+RC), aumentaram a concentração de adiponectina quando comparados ao grupo OVX ($p<0,005$); porém, ainda apresentaram menor valor quando comparados ao grupo SHAM ($P<0,05$), mostrando que a OVX reduz a concentração de adiponectina sanguínea e demonstrando o envolvimento do hormônio esteroide na regulação da adiponectina. Cumpre ressaltar que a ovariectomia aumenta a gordura corporal, entretanto reduz a produção de adiponectina [53].

A restrição calórica tem sido associada com elevada concentração plasmática de adiponectina [46,48]. Nota-se que os animais OVX RC apresentaram maiores concentrações de adiponectina do que os animais do grupo OVX (41,28 x 31,48; $p<0,05$). Estudos indicam a importância da associação entre a RC e a atividade física nos níveis de adiponectina, haja visto que a RC e o exercício físico reduzem a massa corporal, a gordura corporal o que, consequentemente, eleva as concentrações de adiponectina sanguíneas [54]. Além disso, a combinação da RC e do exercício físico aumenta a expressão do RNAm da adiponectina no tecido adiposo abdominal [55]. Neste estudo, observamos que o grupo OVX TR+RC teve maior concentração de adiponectina (40,43) do que o grupo OVX (31,48).

A restrição calórica e o exercício físico induzem a redução de massa corporal por vias e mecanismos diferentes que influenciam a concentração de adiponectina. Em indivíduos treinados, há aumento da expressão do RNAm do receptor de adiponectina 1 e 2 no músculo esquelético [55]. No entanto, a restrição calórica está associada com o aumento da adiponectina humana de alto peso molecular (HMW) [56]. No presente estudo, não podemos determinar se o TR e a RC induziram a redução de massa corporal e o aumento da concentração de adiponectina por diferentes mecanismos, pois não aferimos este mecanismo (ou este processo).

É bem estabelecido na literatura que o hipoestrogenismo induz acúmulo de gordura corporal, a qual está relacionada com a resistência à insulina [26,57,58]. A insulina possui diversos efeitos essenciais, como controlar a taxa de glicose no sangue, a proliferação celular, o metabolismo de gordura e proteínas, além de participar da síntese proteica, entre outros. Em diversas células, a insulina se liga ao receptor de insulina (IRS), o qual ativa a PI3K/Akt – que são proteínas quinases com

papel fundamental no mecanismo de ação da insulina no transporte e no metabolismo da glicose [59]. No estudo de Shen e colaboradores [60], as ratas OVX submetidas à dieta rica em gordura (HFD) apresentaram resistência à insulina, porém, quando tratadas com terapia hormonal (estradiol), apresentaram maior atividade da proteína Akt e, conseqüentemente, melhora na sensibilidade à insulina. Assim, a deficiência de estrogênio contribuiu para a resistência à insulina.

Relatos da literatura indicam que a RC, em longo prazo, promove sensibilidade à insulina, associada a baixos níveis de insulina e glicose, por ativar proteínas da via de sinalização da insulina [61,62]. Pranassong et al. [34] demonstraram que o transporte de glicose, estimulado pela insulina, foi reduzido no músculo esquelético de ratas OVX, com correspondente redução no nível de expressão da proteína Glut 4. No presente estudo, não observamos mudanças significativas nas concentrações sanguíneas de glicose, insulina e de algumas proteínas da via de sinalização da insulina após a ovariectomia. No estudo de Babuei et al. [26], foi mostrado que as ratas OVX não apresentaram alteração nos parâmetros bioquímicos (glicose, insulina e HOMA) quando comparadas ao grupo SHAM – estes dados são condizentes com nosso estudo. Toth et al. [63] relataram que mulheres na pós-menopausa têm maior acúmulo de gordura corporal, sem diferença em marcadores de sensibilidade à insulina. A sensibilidade à insulina no organismo depende de mecanismo de regulação de genes da via de sinalização de insulina em diversos tecidos alvo da insulina e da interação entre esses tecidos em resposta a diferentes dietas ou mutações que alteram a sinalização de insulina [64,65]. Esta discrepância pode estar relacionada ao tipo e à duração do exercício físico, da restrição calórica, do tecido estudado e da linhagem do rato, bem como o método utilizado para analisar a resistência à insulina.

Conclusão

Nossos resultados mostram que a ovariectomia, em modelo animal, causa aumento de massa corporal e gordura corporal e redução das concentrações sanguíneas de Adiponectina, mas não altera a sensibilidade à insulina. As

intervenções, RC e TR, isoladas ou combinadas, reduziram a massa corporal e a gordura corporal, além de aumentarem a concentração de adiponectinas em ratas ovariectomizadas.

Referências

1. Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. *Semin Reprod Med* 2010;28:426–434.
2. Escriva F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascual-Leone AM, Andres A, et al. In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology* 1997;138:49–54.
3. Vieira Potter VJ, Strissel KJ, Xie C, Chang E, Bennett G, Defuria J, et al. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. *Endocrinology* 2012; 153.9:4266-4277.
4. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 2009;58: 38-47.
5. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? a review article. *Dig Dis Sci* 2009;. 54:1847–1856.
6. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 623-631.
7. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:85–97.
8. Sargis RM, Neel BA, Brock CO, Lin Y, Hickey AT, Carlton DA, et al. the novel endocrine disruptor tolylfluand impairs insulin signaling in primary rodent and human adipocytes through a reduction in insulin receptor substrate-1 levels. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:952-60.
9. Kuller LH, Simkin-Silverman LR, Wing RR, Meilahn EN, Ives DG. Women's healthy lifestyle project: A randomized clinical trial at 54 months. *Circulation* 2001;103:32-37.

10. Wildman RP, Schott LL, Brockwell S, Kuller LH, Sutton-Tyrrell KA. A dietary and exercise intervention shows menopause-associated progression of subclinical atherosclerosis as measured by intima-media thickness on the carotid arteries. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:579-85.
11. Whitcroft S, Herriot A. Insulin resistance and management of the menopause: a clinical hypothesis in practice. *Menopause* 2011;17:24-8.
12. Pug TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 1999;20:157-65.
13. Trepanowski JF, Canale RE, Marshall KE, Kabir MM, Bloomer R. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr J* 2011;10:107-18.
14. Pedrosa RG, Tirapegui J, Rogero MM, Pires ISO, Castro IA, Salgado M et al. Assessment of the nutritional status of rats submitted to food restriction and/or to physical exercise. *Nutr Res* 2004;24:923-34.
15. DiPietro L. Exercise training and fat metabolism after menopause: implications for improved metabolic flexibility in aging. *J Appl Physiol* 2010;109:1569-70.
16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GG. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939-51.
17. Pedrosa JA, Nishimura LS, de Matos-Neto EM, Donato JJR, Tirapegui J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell Biochem Funct* 2014;326-32.
18. Horneberger TAJR, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 2004;29:16-31.
19. Domingos MM, Rodrigues MFC, Stotzer US, Bertucci DR, Souza MVC, Marine DA, et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur. J Appl Physiol* 2012; 112:1437-44.
20. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 374-8.

-
21. Fisher JS; Kohrt wm, Brown M. Food restriction suppresses muscle growth and osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 2000;88:265-71.
 22. Geary N. Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalized body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1999;67:371-7.
 23. Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. Sex and menopause associated changes in body fat distribution. *Am J Clin Nutr* 1992;55:050-4.
 24. Yoneda N, Saito S, Kimura M., Yamada M, Iida M, Murakami T, et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res* 1998;30:263-5.
 25. Shimemura K, Shimizu H, Tsuchiya T, Abe Y, Uehara Y, Mori M. Is leptina a key fator which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J* 2002; 49:417-23.
 26. Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int* 2010; 16: 100–104.
 27. Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, SPINDLER SR. Genomic profiling os short and long-term caloric restrition effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10630-5.
 28. Barger JL, Anderson RM, Newton MA, Da Silva C, Vann JA, PUGH TD, et al. A Conserved transcriptional signature of delayed aging and reduce disease vulnerability is partially mediated by SIRT 3. *Plos One* 2015;10(4):e0120738. Doi:10.1371/jornal.pone.0120738.
 29. Anderson RM, Weindruch R. The caloric restrition paradigma: implications for healthy humam aging. *Am J Hum Biol* 2012;24:101-6.
 30. Weindruch RH, Walford RL. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, Illinois, USA: Charles C Thomas; 1988.
 31. Frank LL, Sorensen BE, Yasui Y, Tworoger SS, Schwartz RS, Ulrich CM, et al. Effects of exercise on metabolic risk variables in overweight postmenopausal women: a randomized clinical trial. *Obes Res* 2005;13: 615–625.
 32. Brown T, Avenell A, Edmunds LD, Moore H, Whittaker V, Avery L, et al. Systematic review of long-term lifestyle interventions to prevent weight gain and morbidity in adults. *Obes Rev* 2009;10: 627–638.
 33. Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Antao N, Baynard T , Woods JÁ. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic

- complications in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:1164-71.
34. Prasannarong M, Vichaiwong K, Saengsirisuwan V. Caloric restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1051-61.
35. Barsalani R, Riesco É, Perreault K, Imbeault P, Brochu M, Dionel J. Variation in C-reactive protein following weight loss in obese insulin resistant postmenopausal women: is there an independent contribution of lean body mass? *Exp clin endocrinol diabetes* 2015;123:198-203.
36. Myette-Côté É, Doucet É, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM, Brochu M. Changes in glucose disposal after a caloric restriction-induced weight loss program in obese postmenopausal women: characteristics of positive and negative responders in a Montreal-Ottawa New Emerging Team study. *Menopause* 2015;22:96-103.
37. Arguin H, Dionne IJ, Sénéchal M, Bouchard DR, Carpentier AC, Ardilouze JL, et al. Short- and long-term effects of continuous versus intermittent restrictive diet approaches on body composition and the metabolic profile in overweight and obese postmenopausal women: a pilot study. *Menopause*. 2012;19:870-6.
38. Imaiya I, Ulrich CM, Alfano CM, Wang C, Xiao L, Wener MH, et al. Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Cancer Res*. 2012;72:2314-26.
39. Pighon A, Barsalari R, Yasari S, Prud'homme D, Lavoie JM. Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climacteric* 2010;13: 238–48.
40. Deon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005;280:35983–91.
41. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increase adipose tissue in male and female estrogen receptor alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:12729–34.
42. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Misso ML, Wreford NG, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;79: 3–9.

-
43. Pighon A, Gutkowska J, Jankowski M, Rabasa-Lhoret R, Lavoie JM. Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism*. 2011;60:629-39.
 44. Jackson KC, Wohlers LM, Lovering RM, Schuh RH, Maher AC, Bonen A, et al. Ectopic lipid deposition and the metabolic profile of skeletal muscle in ovariectomized mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;304:206-17.
 45. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004;53:143-51.
 46. Wang X, You T, Murphy K, Lyles MF, Nicklas BJ. Addition of Exercise Increases Plasma Adiponectin and Release from Adipose Tissue. *Med Sci Sports Exerc*. 2015 Mar 25. [Epub ahead of print]
 47. Yan J, Gan L, Qi R, Sun C. Adiponectin decreases lipids deposition by p38 MAPK/ATF2 signaling pathway in muscle of broilers. *Molecular biology reports* 2013;40:7017-25.
 48. Punyadeera C, Zorenc AGH, Koopman R, McAinch AJ, Smit E, Manders R, et al. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:427-36.
 49. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003;46:459–69.
 50. Im JA, Lee JW, Lee HR, Lee DC. Plasma adiponectin levels in postmenopausal women with or without long-term hormone therapy. *Maturitas* 2006;54:65–71
 51. Camara C, Zhou LY, Ma Y, Zhu L, Yu D, Zhao YW, Yang NH. Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014;34:825-9.
 52. Tawfik SH, Mahmoud BF, Saad MI, Shehata M, Kamel MA, Helmy MH. Similar and additive effects of ovariectomy and diabetes on insulin resistance and lipid metabolism. *Biochem Res* 2015;2015:567945. doi: 10.1155/2015/567945.

-
53. Fu Y, Luo N, Klein R, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005;46:1369-79.
 54. Hamer M, Steptoe A. Walking, vigorous physical activity, and markers of hemostasis and inflammation in healthy men and women. *Scand J Med Sci Sports*. 2008;18:736-41.
 55. Christiansen T, Paulsen SK, Bruun JM, Ploug T, Pedersen SB, Richelsen B. Diet-induced weight loss and exercise alone and in combination enhance the expression of adiponectin receptors in adipose tissue and skeletal muscle, but only diet-induced weight loss enhanced circulating adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:911-9.
 56. Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, apkulat S, Weickert MO, Möhlig M, et al. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes*. 2005;54:2712-9.
 57. Munoz J, Derstine A, Gower BA. Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. *Obes Res* 2002;10:424–31
 58. Tchernof A, Desmeules A, Richard C, Laberge P, Daris M, Mailloux J, et al. Ovarian hormone status and abdominal visceral adipose tissue metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3425–30.
 59. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:581-91.
 60. Shen M, Kumar SPDF, Shi H. Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;17: 99–107.
 61. Bartke a. Growth hormone, insulin and aging: the benefits of endocrine defects. *Exp Gerontol* 2011;46:108-11.
 62. Dean DJ, Cartee GD. Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand* 2000;169:1339.
 63. Toth MJ, Sites CK, Eltabbakh GH, et al. Effect of menopausal status on insulin-stimulated glucose disposal. *Diabetes Care* 2000;23:801–6.
 64. Dominici FP, Turyn D. Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227:149-157.

-
65. Yu YH, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res.* 2005; 96:1042-1052.

Tabela 1: composição das rações experimentais

Ingredientes	Ração Controle	Ração Restrição Calórica
	g/Kg	g/Kg
Amido	620.692	501.14
Sacarose	100.000	100.000
Celulose	50.000	71.430
Caseína	140.000	200.000
L-cistina	1.800	2.430
Óleo de soja	40.000	57.140
Mistura de minerais	35.000	50.000
Mistura de vitaminas	10.000	14.290
Bitartarato de colina	2.500	3.570
Tetrabutyl-hidroquinona	0.008	0.008

As rações utilizadas foram adaptadas de Pedroso et al 2014 e Reeves et al. 1993.

Tabela 2: Características metabólicas basais dos grupos experimentais

	OVX	OVX RC	OVX TR	OVX TR+RC	SHAM	SHAM RC	SHAM TR	SHAMTR+RC
Massa corpora inicial (g)	274±05	293±06	292±06	283±06	276±05	285±08	283±09	279±08
Massa corporal final (g)	468±13 ^{e,b,c,d}	404±10 ^{a,d,e,f}	417±16 ^{a,d,e,g}	364±09 ^{a,b,c,h}	372±14 ^{a,f}	322±07 ^{b,g,h}	357±13 ^{f,h}	304±06 ^{b,f,g}
Massa do útero (g)	0.13±0.01 _{c,e}	0.13±0.01 ^{c,e,f}	0.21±0.03 _{a,b,d,e}	0.12±0.01 ^{d,e,h}	0.75±0.01 ^{a,b,c,d}	0.54±0.03 ^{b,e,g,h}	0.64±0.08 ^{c,e,f}	0.30±0.03 ^{d,e,f}
Gordura corporal (g)*	69.21±8.4 ^{b,c,d,e}	48.92±8.89 ^{a,d,e,f}	44.94±19.73 ^{a,d,g}	23.19±11.9 ^{a,b,c}	29.01±6.10 ^{a,b}	13.76±3.36 ^b	29.63±9.68 _h	12.13±4.58 ^g
Consumo alimentar (g/dia)	20.83±1.4 ^{b,e,d}	17.82±1.08 ^{a,c,d,f}	20.4±1.7 ^{b,d}	14.67±1.71 ^{a,b,c,e,h}	18.64±0.9 ^{a,d,f,h}	13.31±1.15 ^{b,e,g}	19.02±1.58 ^{f,h}	12.27±1.18 ^{e,g}
Carga máxima de carregamento (g)			1065±41	1096±28			1113±16	1060±27

* representa a soma dos tecidos adiposos mesentérico, parametrial, retroperitoneal e subcutâneo. Dados expressos em médias e desvio padrão. Grupo OVX (Ovariectomia, n=10); OVX RC (Ovariectomia com restrição calórica, n=10); Grupo OVX TR (Ovariectomia treinado, n=10); Grupo OVX TR+RC (Ovariectomia treinado com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM (n=010); SHAM RC (SHAM restrição calórica, n=10); Grupo SHAM TR (SHAM treinado, n=10); e Grupo SHAM TR+RC (SHAM treinado com restrição calórica, n=10). $p < 0.05$ comparado aos grupos ^aOVX; ^bOVX RC; ^cOVX TR; ^dOVX TR+RC, ^eSHAM, ^fSHAM RC, ^gSHAM TR; ^hSHAMTR+RC

Tabela3: Marcadores bioquímicos após 13 semanas de intervenções

	OVX	OVX RC	OVX TR	OVX TR+RC	SHAM	SHAM RC	SHAM TR	SHAMTR+RC
Glicose (mg/dL)	118.5±15.8 7	122.0±12.35	126.8±11.13	129.9±10.02	128.4±10.21	134.6±10.90	128.8±8.22	142.0±12.13
Insulina (pg/mL)	1379±325.6	1385±163.3	2378±1867	2828±1208	1355±263.3	2865±638.3	1652±222.8	3045±1153
Adiponectina (pg/dL)	31.48±2.0 ^{b,c} ,d,e	41.28±5.0 ^{a,e,f}	39.79±1.2 ^{b,e,g}	40.43±4.6 ^{b,e}	49.0±3.3 a,b,c,d,h	49.0±3.0 ^b	48.6±1.6 ^c	49.5±2.8 ^d

Dados expressos em médias e desvio padrão. Grupo OVX (Ovariectomia, n=10); OVX RC (Ovariectomia com restrição calórica, n=10); Grupo OVX TR (Ovariectomia treinado, n=10); Grupo OVX TR+RC (Ovariectomia treinado com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM (n=10); SHAM RC (SHAM restrição calórica, n=10); Grupo SHAM TR (SHAM treinado, n=10); e Grupo SHAM TR+RC (SHAM treinado com restrição calórica, n=10). $p < 0.05$ comparado aos grupos ^aOVX; ^bOVX RC; ^cOVX TR; ^dOVX TR+RC; ^eSHAM; ^fSHAM RC; ^gSHAM TR; ^hSHAMTR+RC.

Tabela 4: Velocidade de decaimento da glicose durante o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (kitt).

Grupos	ITT inicial (%min ⁻¹)	ITT final (%min ⁻¹)
OVX	2.48±0.85	3.03±0.48 ^{c,d,e}
OVX RC	2.29±0.43	3.01±0.54 ^{c,f}
OVX TR	2.46±0.58	2.08±0.4 ^{a,b}
OVX TR+RC	2.47±0.68	2.21±0.32 ^a
SHAM	2.42±0.75	2.02±0.87 ^a
SHAM RC	2.34±0.62	2.03±0.67 ^b
SHAM TR	2.43±0.51	1.80±0.31
SHAM TR+RC	2.39±0.44	2.27±0.88

Dados expressos em médias e desvio padrão. Grupo OVX RC (ovariectomia com restrição calórica, n=10); Grupo OVX TR (ovariectomia treinado, n=10); Grupo OVX TR+RC (ovariectomia treinado com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM RC (SHAM com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM TR (SHAM treinado, n=10); e Grupo SHAM TR+RC (SHAM treinado com restrição calórica, n=10). $p < 0.05$ comparado ao grupo ^aOVX; ^bOVX RC; ^cOVX TR; ^dOVX TR+RC, ^eSHAM, ^fSHAM RC, ^gSHAM TR; ^hSHAMTR+RC.

Figura 1. Análise da via da insulina no tecido adiposo subcutâneo por *western blotting*. Akt total, p-Akt (tyr 308), PI3K e Glut 4. Grupo OVX RC (ovariectomia com restrição calórica, n=10); Grupo OVX TR (ovariectomia treinado, n=10); Grupo OVX TR+RC (ovariectomia treinado com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM RC (SHAM com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM TR (SHAM treinado, n=10); e Grupo SHAM TR+RC (SHAM treinado com restrição calórica, n=10). $p < 0.05$ comparado ao grupo ^aOVX; ^bOVX RC; ^cOVX TR; ^dOVX TR+RC, ^eSHAM, ^fSHAM RC, ^gSHAM TR; ^hSHAMTR+RC.

Figura 2. Análise da via da insulina no tecido adiposo retroperitoneal por *western blotting*. Akt total, p-Akt (tyr 308), PI3K e Glut 4. Grupo OVX RC (ovariectomia com restrição calórica, n=10); Grupo OVX TR (ovariectomia treinado, n=10); Grupo OVX TR+RC (ovariectomia treinado com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM RC (SHAM com restrição calórica, n=10); Grupo SHAM TR (SHAM treinado, n=10); e Grupo SHAM TR+RC (SHAM treinado com restrição calórica, n=10). $p < 0.05$ comparado ao grupo ^aOVX; ^bOVX RC; ^cOVX TR; ^dOVX TR+RC, ^eSHAM, ^fSHAM RC, ^gSHAM TR; ^hSHAMTR+RC.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que a ovariectomia, em modelo animal, causa aumento de massa corporal e gordura corporal e redução das concentrações sanguíneas de Adiponectina, mas não altera a sensibilidade à insulina. As intervenções, RC e TR, isoladas ou combinadas, reduziram a massa corporal e a gordura corporal, além de aumentarem a concentração de adiponectinas em ratas ovariectomizadas.

7 REFERÊNCIAS

AGUEDA, M.; LASA, A.; SIMON, E.; ARES R.; LARRARTE, E.; LABAYEN, I. Association of circulating visfatin concentrations with insulin resistance and low-grade inflammation after dietary energy restriction in Spanish Obese non-diabetic women: Role of body composition changes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v.22, p. 208-14, 2012.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* v. 11, p. 327-332, 2000.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann. Med.* v. 27, p. 435-438, 1995.

ARNER, P. Visfatin- A true or false trailo type 2 diabetes mellitus. *J. Clin Endocr. Metab.* v.1, p. 28-30, 2006.

Camara C.; Zhou L.Y.; Ma Y.; Zhu L.; Yu D.; Zhao Y.W.; Yang N.H. Effect of ovariectomy on serum adiponectin levels and visceral fat in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* v. 34, p825-9, 2014.

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol metab.* v. 2, p. 304-312, 2006.

CARR, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 88, p. 2404–2411, 2003.

DiPIETRO L. Exercise training and fat metabolism after menopause: implications for improved metabolic flexibility in aging. *J Appl Physiol.* v.109, p.1569-1570, 2010.

DOMINGOS, M.M.; RODRIGUES, M.F.C.; STOTZER, U.S.; BERTUCE, D.R.; SOUZA, M.V.C.; MARINE, D.A, et al. Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur. J Appl Physiol.* v. 112, p. 1437-1444, 2012.

DONATO, J.J.; PEDROSA, R.G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. *Rev Bras Cienc Farm.* v.40, p. 273-287, 2004.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 50, p. 216-229, 2006.

GENARO, P.S.; SARKIS, K.S.; MARTINI, L.A. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 53, p.667-672, 2009 .

GUIMARÃES, D.E.D.;SARDINHA, F.L.C.; MIZURINI, D.M.; CARMO, M.G.T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr Campinas*. v. 5, p. 549-559, 2007.

GREENDALE, G.A.; LEE, N.P.; ARRIOLA, E.R. The menopause. *Lancet*. v.35, p. 571-580, 1999.

HORNBERGER, T. A. JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. v. 29, p. 16–31, 2004.

HOTAMISLIGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE M.F.;SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. v.271, p. 665-8, 1996.

IMAYAMA, I.; ULRICH C.M.; ALFANO, C.M.; WANG, W.; XIAO L.; WENER, M.H. et al. Effects of a Caloric Restriction Weight Loss Diet and Exercise on Inflammatory Biomarkers in Overweight/Obese Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Cancer Res*. v.72, p. 2314–26, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Censo demográfico: Brasil, 2010*. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JIANPING,Y.; KELLER, J.N. Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging*. v. 2, p. 361-368, 2010.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone miner*. v. 15, p.175-192, 1991.

KULLER, L.H.; SIMKIN-SILVERMAN, L.R.;WING, R.R.; MEILAHN E.N.; IVES D.G. Women's Healthy Lifestyle Project: A Randomized Clinical Trial Results at 54 Months *Circulation*. v.103, p.32-37, 2001.

LEE, I.S.; SHIN, G.; CHOUE, R. 12-week regimen of caloric restriction improves levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in Korean women with BMIs greater than 23kg/m. *Inflamm Res*. v. 59, p. 399-405, 2010.

LEITE, R.D.; PRESTES, J.; BERNARDES, C.F.; SHIGUEMOTO, G.E.;PEREIRA, G.B.; DUARTE, J.O.; et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab*. v. 34, p. 1079-1086, 2009.

LOVEJOY, J.C.; CHAMPAGNE, C.M.; DE JONGE, L.; XIE, H.; SMITH, S.R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes.* v. 32, p. 949–958, 2008.

OLSON, S. H.; BANDERA, E. V.; ORLOW, I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* v. 165, p. 235-45, 2007.

PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J.; ROGERO, M. M.; CASTRO, I. A.; PIRES, I. S. O.; OLIVEIRA, A. A. M. Influência do exercício físico na composição química da massa corporal magra de ratos submetidos à restrição alimentar. *Rev Bras Cienc Farm.* v.40, p. 27-34, 2004a.

PEDROSA, R. G.; TIRAPEGUI, J.; ROGERO, M.; PIRES, I. S. O.; CASTRO, I. A. C.; SALGADO, M.; UEDA, M. Assessment of the nutritional status of rats submitted to food restriction and/or to physical exercise. *Nutr Res.* v. 24, p. 923-934, 2004b.

PEDROSO, J.A.B; Nishimura, L.S.; de Matos-Neto, E.M.; Donato J.J.R.; Tirapegui, J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell Biochem Funct* p.326-32, 2014.

POLOTSKY, H.N.; POLOTSKY, A.J. Metabolic implications of menopause. *Seminars in reproductive medicine.* v. 28, p. 426-434, 2010.

PRASANNARONG, M.; VICHAIWONG, K.; SAENGSIKISUWAN, V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1822, p. 1051-1061, 2012.

PUG, T.D.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiology of aging.* v.20, p. 157-165, 1999.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* v. 123, p. 1939-1951, 1993

RIBEIRO, S.M.; DONATO, J.J.; TIRAPEGUI, J. Nutrição e envelhecimento. In: *Nutrição, Fundamentos e Aspectos Atuais.* TIRAPEGUI, J. 2 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 10, p. 127-142, 2006.

RIBEIRO, S.M.L.; SANTOS, Z.A.S.; SILVA, R.J.; LOUZADA, E.; DONATO, J.J.; TIRAPEGUI, J. Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 51, p. 11-24, 2007.

ROCHA, S.V.S.; TIRAPEGUI, J.; MELO, C.M.; RIBEIRO, S.M.L. Efeito do exercício físico nos fatores de risco de doenças crônicas em mulheres obesas. *Rev Bras Cienc Farm.* v. 44, p.185-192, 2008.

RYAN, A.S.; TREUTH, M.S.; HUNTER, G.R.; ELAHI, D. Resistive training maintains bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue.* v. 62, p. 295-299, 1998.

SHIGUEMOTO, G.E.; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C.H.; FONT, G.M.; VARGAS, V.; PEREZ, S.E.A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas.* v. 57, p. 261-270, 2007.

SHIGUEMOTO, G.E.; PRESTES, J.; LEITE, G. B.; PEREIRA, C. L.S.; PONTES, F.V.; D'A VILA, J.P.; BOTERO, V.; BALDISSERA, K. O.; SELISTRE-DE ARAÚJO, S. E.A. Effects of resistance training on matrix metalloproteinase-2 activity and biomechanical and physical properties of bone in ovariectomized and intact rats. *J Med Sci Sports.* v.22, p. 607-617, 2012.

SANTOS, Z. A.; SILVA, R. J.; Tirapegui, j.; RIBEIRO, S. M. L. . Effect of food restriction and intense physical training on estrous cyclicity and plasma leptin concentration in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* v. 57, p. 1-8, 2011.

SILVA, T.A.; FRISOLI JUNIOR, A.; PINHEIRO, M.M. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol.* v. 46, p. 391-397, 2006

STEFANICK, M. L. ; ANDERSON, G. L. ; MARGOLIS, K. L. ; HENDRIX, S. L. ; RODABOUGH, R. J. ; PASKETT, E. D. ; LANE, D. S. ; HUBBELL, F. A. ; ASSAF, A. R. ; SARTO, G. E. ; SCHENKEN, R. S. ; YASMEEN, S. ; LESSIN, L.; CHLEBOWSKI, R. T. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA.* v. 295, p. 1647-57, 2006.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* v.17, p.125-133, 1995

TORRES-LEAL, F. L.; CAPITANI, M. D. de; TIRAPEGUI, J. Considerations about the effect of physical exercise and caloric restriction on the components of metabolic syndrome. *Braz J Pharm Sciences.* v.45, p. 379-399, 2009.

TREPANOWSKI, J.F.; CANALE, R.E.; MARSHALL, K.E.; KABIR, M.M.; BLOOMER, R. impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr J.* v.10, p.107-118, 2011.

VIANNA, D.; TEODORO, G.F.R.; TORRES-LEAL, F.L.; PANTALEÃO, L.C.; DONATO, J.J.; TIRAPÉGU, J. Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. *Nutrition*. v. 28, p. 182-189, 2012.

VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (VIGITEL). Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. v. 21, p. 697–738, 2000.

WILDMAN, P.R.; SCHOTT, L.L.; BROCKWELL, S.; KULLER, L.H.; SUTTON-TYRRELL, K. A dietary and exercise intervention slows menopause-associated progression of subclinical atherosclerosis as measured by intima-media thickness of the carotid arteries. *J Am Coll Cardiol*. v. 44, p. 579 – 85, 2004.

WILDMAN, R.P.; SOWERS, M.F. Adiposity and the menopausal transition. *Obstet Gynecol Clin N Am*. v. 38, p. 441–454, 2011.

XIANG, L.; HE, G. Caloric restriction and antiaging effects. *Ann Nutr Metab*. v.58, p. 42-48, 2011.

ZHANG, S. M. ; MANSON, J. E. ; REXRODE, K. M. ; COOK, N. R. ; BURING, J. E.; LEE, I. M. Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*. v. 165, p. 524-9, 2007.

ZOTH, N.; WEIGT, C.; ZENGİN, S.; SELDER, O.; SELKE, N.; KALICINSKI, M.; PIEHOTTA, M.; DIEHL, P. Metabolic effects of estrogen substitution in combination with targeted exercise training on the therapy of obesity in ovariectomized Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. v. 130, p. 64-72, 2012.

8 ANEXOS

**ANEXO 1. INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS
JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

**ANEXO 2. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
nº 004/2013

Protocolo nº. 004/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *"Efeito do treinamento físico e da restrição calórica na composição corporal, na via de sinalização da insulina e na remodelação óssea de ratas ovariectomizadas"* submetido pela pesquisadora *Daiana Vianna Amianti*.

São Carlos, 21 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO 3. FICHA DO ALUNO.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 5838452/2 - Daiana Vianna

Email: daianavianna@usp.br
Data de Nascimento: 18/01/1984
Cédula de Identidade: RG - 8.796.667-4 - PR
Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Centro Universitário Filadélfia - Paraná - Brasil - 2005
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 20/07/2011
Início da Contagem de Prazo: 20/07/2011
Data Limite para o Depósito: 20/07/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco - 20/07/2011 até 07/09/2011. Email: bfranco@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 08/09/2011 até o presente. Email: tirapegu@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/07/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 02/09/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 20/07/2011

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 14/07/2015 12:32:17

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 5838452/2 - Daiana Vianna

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EEF5705-1/3	Influência do Treinamento Físico e da Genética no Controle de Peso Corporal (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	09/08/2011	27/09/2011	60	4	83	A	N	Concluída
FBA5899-2/2	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	05/03/2012	15/04/2012	90	6	80	A	N	Concluída
BMH5745-3/3	Compartimentalização e Metabolismo de Lipídeos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/04/2012	15/05/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5712-5/4	Fisiologia da Nutrição I	16/04/2012	27/05/2012	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5875-2/1	Metabolismo Ósseo (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/08/2012	26/08/2012	90	6	100	A	N	Concluída
BMB5804-2/5	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	22/10/2012	03/12/2012	60	4	90	A	N	Concluída
EFB5759-1/2	Suplementação Nutricional Aplicada à Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	07/11/2012	28/12/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
RBQ5753-4/2	Metabolismo e Bioenergética (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	04/04/2013	13/06/2013	120	8	90	A	N	Concluída
SFI5836-4/4	Práticas Pedagógicas & Comunicação e Expressão Oral (Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo)	12/03/2014	01/07/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	28
Estágios:			
Total:	0	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 09/02/2015

Impresso em: 14/07/2015 12:32:17

ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES.

Daiana Vianna

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0364116925423024>

Última atualização do currículo em 14/07/2015

Resumo informado pelo autor

Graduada em Nutrição pelo Centro Universitário Filadélfia (2005) e Mestre em Ciências pela Universidade de São Paulo (2009). Doutoranda na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ USP no departamento de Ciências dos alimentos área de nutrição experimental (2011). Professora em cursos de pós-graduação Lato Sensu do ENAF/Desenvolvimento Serviços Educacionais, Estácio de Sá, Faculdade Integrada de Santo André (FEFISA), Faculdade Monte Negro Polo Manaus e Escola Superior de Pesquisa e Pós-Graduação (Instituto Lá Verit'a). Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Nutrição clínica, nutrição esporte e nutrição e envelhecimento. Atuando principalmente nos seguintes temas: leucina, aminoácido de cadeia ramificada, dieta restrita, exercício físico composição corporal, tecido adiposo, insulina e síntese proteica.

(Texto informado pelo autor)

Links para Outras Bases:

[SciELO - Artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome	Daiana Vianna
Filiação	Clemente Sauzer Vianna e Mari Vianna
Nascimento	18/01/1984 - Panambi/RS - Brasil
Carteira de Identidade	87966674 SSP-PR - PR - 30/07/1999
CPF	046.635.889-05
Endereço residencial	Rua Pedro Fernandes Alonso, 28 Santa Felicia - Sao Carlos 13562-380, SP - Brasil Telefone: 11 99785854
Endereço profissional	Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo Av Professor Lineu prestes, 580 Cidade universitária - Sao Paulo 05508-000, SP - Brasil Telefone: 11 30913309
Endereço eletrônico	E-mail para contato : daiana.vianna@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Ciência dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido na composição corporal e em marcadores de resistência à insulina de ratas ovariectomizadas.
Orientador: Julio Orlando Tiraegui Toledo
Co-orientador: Gilberto Eiji Shigemoto
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2009** Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos., Ano de obtenção: 2009
Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tiraegui Toledo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2002 - 2005** Graduação em Nutrição.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
Título: Avaliação Físico Química e Microbiológica do Iogurte de Soja, Sabor Morango.
Orientador: Solange Aparecida Neves
- 1999 - 2001** Ensino Médio (2o grau).
Colégio Santo Antônio, CPSA, Brasil
- 1991 - 1998** Ensino Fundamental (1o grau).
Colégio Santo Antônio, CPSA, Brasil

Formação complementar

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Aprimoramentos em Nutrição no Esporte.
Globalnutri, GLOBALNUTRI, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Aprimoramento em nutrição no Esporte módulo II.
Globalnutri, GLOBALNUTRI, Brasil
- 2006 - 2006** Nutrição Aplicada à Prática Esportiva.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Nutrição Aplicada ao Exercício Físico e ao Esporte.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Nutrição Clínica Funcional.
Korppus, JOPEF, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Nutrição e Mulher.
Korppus, JOPEF, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em I Curso de Nutrição Clínica CEQNEP.
Centro de Excelência em Nutrição Clínica, CEQNEP, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Reaproveitamento de Alimentos.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Interpretação de Exames Laboratoriais.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Gestação, Amamentação e Cuidados com Recém Nascido.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Dietas e Sistemas de Equivalência para Diabetes.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em I Curso de Segurança Alimentar e Nutricional.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em A Importância da Gordura na Alimentação.
Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Brasil

Atuação profissional

1. ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais - ENAF

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor Pós-Graduação Latu sensu, Regime: Parcial

2. Escola Superior de Pesquisa e Pós-Graduação - ESPPOS

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor Pós-Graduação Latu sensu, Regime: Parcial

3. Faculdades Integradas de Santo André - FEFISA

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor Pós-Graduação Latu sensu, Regime: Parcial

4. Faculdade Estacio De Sá - ESTÁCIO DE SÁ

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor Pós-Graduação Latu sensu, Regime: Parcial

5. Faculdade Montenegro polo Manaus - MANAUS

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor Pós-Graduação Latu sensu, Regime: Parcial

6. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP - FCF

Vínculo institucional

2012 - Atual

7. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Professor convidado, Regime: Parcial

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Professora Convidada, Regime: Parcial

2011 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Discente de Pós-graduação, Regime: Parcial

2009 - 2009 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio Docência , Carga horária: 6, Regime: Parcial

2007 - 2009 Vínculo: Bolsista mestrando , Enquadramento funcional: Discente de Pós-Graduação, Regime: Dedicção exclusiva

8. Body Check - BODY CHECK

Vínculo

institucional	
2008 - 2011	Vínculo: Autonomo , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 22, Regime: Parcial
9. Colégio Dante Alighieri - DANTE	
Vínculo institucional	
2008 - 2008	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Palestrante, Regime: Parcial
10. Associação de pais e amigos dos excepcionais de Rolândia - APAE	
Vínculo institucional	
2004 - 2005	Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Nutricionista Voluntária , Carga horária: 8, Regime: Parcial
11. Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL	
Vínculo institucional	
2004 - 2005	Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisa e desenvolvimento , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Atividades	
08/2004 - 12/2005	Extensão Universitária, CEPS - Clínica de Educação para a Saúde
Especificação: Prevenção e Tratamento das alterações músculo - esqueléticas e metabólicas de pacientes portadores de HIV/AIDS.	
12. NutriSelf Sapore Restaurants Para Coletividade Ltda - NUTRISELF	
Vínculo institucional	
2004 - 2004	Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: estágio extra curricular , Carga horária: 8, Regime: Parcial
Atividades	
11/2004 - 12/2004	Estágio, Hussman
Estágio: Administração do serviço alimentar.	
Projetos	
Projetos de pesquisa	
2012 - Atual	<p>Efeito da restrição calórica e do treinamento resistido na composição corporal e em marcadores de resistência à insulina de ratas ovariectomizadas.</p> <p>Descrição: A resistência à insulina esta associada com diversas anormalidades que inclui intolerância a glicose, dislipidemias e obesidade abdominal. Estas anormalidades predis põem a doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e alguns tipos de câncer. A incidência de muitas destas condições aumenta com a menopausa e a resistência a insulina também. Diante destas evidencias é recomendado que mulheres na fase da menopausa submetessem a alguma tratamento a fim de reduzir as chances de desenvolver doenças decorrentes deste periodo. Várias intervenções terapêuticas são propostas, contudo mudança no estilo de vida parece ser a melhor estratégia para controle dos fatores de risco nessa fase da vida da mulher. Recentes estudos, relativos aos efeitos do exercício físico e da restrição energética, têm relatado diversos benefícios sobre fatores metabólicos e de risco para doenças crônicas não transmissíveis. Contudo ainda não sabe por quais mecanismos a associação do exercício físico e da restrição calórica pode melhorar as alterações decorrentes da menopausa e a resistência a insulina. Assim, o seguinte estudo tem como hipótese investigar se a restrição calórica associada com o treinamento físico pode atenuar as mudanças desfavoráveis que ocorrem na composição corporal e na via de sinalização da insulina durante a menopausa. Para isso foram utilizadas 80 ratas fêmeas com idade de 13 semanas, distribuídas em oito grupos, grupo Sham sedentário (n=10), grupo ovariectomia sedentário (n=10), grupo ovariectomia restrição calórica (n=10), grupo ovariectomia treinado (n=10), grupo ovariectomia restrição calórica e treino (n=10), grupo sham restrição calórica (n=10), grupo sham treinada (n=10) e grupo sham treinada restrição calórica (n=10). Inicialmente os animais fizeram o processo cirúrgico para remoção dos ovários e após doze dias de recuperação iniciou-se o protocolo experimental que consiste de treino resistido e restrição calórica. Os resultados obtidos até o momento mostram que os animais ovariectomizados (OVX) possuem mais massa corporal que os animais controles (sham). O consumo alimentar entre os grupos não diferem, somente quando comparados com os grupos submetidos à restrição calórica. Em relação ao treino, também, não há ate o momento diferença entre os grupos treinados. O estudo possui mais dez semanas experimental (treino e restrição calórica). Após o periodo experimental ocorrerá o sacrifício destes animais para obtenção e análise da composição química da carcaça e dos parâmetros teciduais, plasmáticos e séricos.</p> <p>Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (5); Integrantes: Daiana Vianna; Julio Tiraepgui (Responsável); Lucas C. Pantaleão; Gilberto Eiji Shigemoto; Anderson Lino; Markus Vinicius Campos Souza; Marina Rodrigues Barbosa; Cecília Tardivo; Leandro Dias Gonçalves Ruffoni Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP</p>
2007 - 2009	<p>Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos</p> <p>Descrição: Diversos estudos demonstraram que a administração aguda de leucina é capaz de atenuar a perda de massa muscular que ocorre no envelhecimento. Contudo, poucos estudos verificaram o efeito crônico dessa suplementação na composição corporal e em parâmetros metabólicos. O presente estudo analisou o efeito da suplementação com leucina durante 40 semanas na composição corporal, parâmetros bioquímicos e teciduais de ratos envelhecidos. Para isso foram utilizados 40 animais Sprague-Dawley, com 6 meses de idade, os quais foram distribuídos em três grupos experimentais. Grupo adulto (n=10), ratos eutanaziados no início do experimento; Grupo Controle, recebeu ração contendo uma mistura de aminoácidos não essenciais por 40 semanas e; Grupo Leucina, recebeu ração contendo 4% de leucina por 40 semanas. Durante o experimento foi avaliado o consumo alimentar e o peso corporal. Após as 40 semanas de experimento os animais foram eutanaziados com intervalo de 5 horas de jejum (período pós-</p>

prandial) para coleta de soro sanguíneo e tecidos. Avaliaram-se: a composição química da carcaça; a massa de órgãos e dos músculos gastrocnêmio e sóleo; as concentrações de proteína e RNA no fígado e no músculo gastrocnêmio; o aminograma sanguíneo; as concentrações séricas de IGF-1, insulina, proteínas totais, albumina, glicose e perfil lipídico. Em relação ao peso corporal, o grupo leucina apresentou menor massa corporal quando comparado ao grupo controle ($p<0,005$). No entanto, não houve diferença entre o grupo leucina e o controle em relação ao consumo alimentar. Ambos os grupos de animais envelhecidos apresentaram aumento da gordura corporal em comparação aos animais adultos, porém o grupo leucina apresentou menor conteúdo de gordura corporal (somatória dos depósitos de gorduras e porcentagem de gordura total) do que o grupo controle. Os animais envelhecidos dos grupos leucina e controle apresentaram maiores concentrações de glicose, triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL e insulina quando comp

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (3); Doutorado (1);
Integrantes: Daiana Vianna; Gabriela Fulin Resende Teodoro; Francisco Leonardo Torres-Leal; Jose Donato Junior; Tiraepgui, J. (Responsável)
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2007 - 2010 Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada em proles submetidas à desnutrição protéica materna

Descrição: Estudos em animais mostram que a desnutrição protéica intra-uterina pode acarretar redistribuição do fluxo sanguíneo intra-útero, podendo promover modificações permanentes na estrutura e funcionalidade de alguns órgãos, o que ocasiona modificações no metabolismo. Além disso, a desnutrição intra-uterina pode afetar a secreção de hormônios que atuam no crescimento fetal, podendo conduzir à restrição do crescimento intra-uterino. Esse fenômeno pode parcialmente ser explicado pela hipótese da programação fetal, na qual é sugerido que ocorra uma adaptação metabólica e fisiológica do feto a uma condição intra-uterina adversa, que pode induzir o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta. Neste contexto, pesquisas com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), sobretudo com leucina, têm verificado a capacidade desses nutrientes promoverem a síntese protéica mesmo em condições catabólicas, por meio da ativação de uma via bioquímica intracelular intercedida pela proteína quinase *Alvo da Rapamicina* em Mamíferos (mTOR), que está envolvida no estímulo à etapa de tradução protéica. Assim, o presente trabalho avaliou o efeito da suplementação de BCAA em proles submetidas à desnutrição protéica materna. Para tanto, ratas Wistar foram acasaladas com ratos adultos de mesma raça. Uma vez constatada a gravidez, as matrizes foram subdivididas em grupos de acordo com a dieta que seria fornecida no decorrer da gestação: CON (20% proteína); VAL/ISO (5% proteína + 2% VAL + 2% ISO); AAE (5% proteína + 4% AAE); e BCAA (5% proteína + 4% BCAA). O protocolo de restrição protéica materna adotado causou redução no crescimento corporal e na massa de órgãos das proles. Embora a suplementação com VAL/ISO e AAE não tenha recuperado os efeitos mediados pela desnutrição, foi constatado que a suplementação com BCAA reverteu parte do déficit observado no crescimento das proles, uma vez que foi eficaz em minimizar ou mesmo em restaurar plenamente diversos parâmetr

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (3); Doutorado (1);
Integrantes: Daiana Vianna; Gabriela Fulin Resende Teodoro (Responsável); Julio Tiraepgui; Francisco Leonardo Torres-Leal; Jose Donato Junior

2007 - 2009 Efeitos da suplementação com leucina e exercício físico na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos previamente submetidos a uma dieta de ganho de peso.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (3); Doutorado (1);
Integrantes: Daiana Vianna; Gabriela Fulin Resende Teodoro; Julio Tiraepgui; Francisco Leonardo Torres-Leal (Responsável); Jose Donato Junior; Mariana Capitani
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2004 - 2004 Intervenção Nutricional para Tratamento de Anemia e Colesterolemia entre Crianças e Adolescentes Assistentes em Dois CAIC's (Centro Integrado a Criança e o Adolescente) - Londrina - PR

Descrição: O Objetivo do seguinte estudo foi analisar o perfil nutricional de crianças e adolescentes assistidos em Dois CAIC's (Centro Integrado a Criança e o Adolescente) - Londrina - PR. E intervir naquelas que apresentaram colesterolemia. Para isso foi feito Avaliação Antropométrica (IMC), Avaliação Antropométrica (NCHS); Avaliação Dietética - Método pesagem direta dos alimentos e exames bioquímicos. Após obter o diagnóstico dos alunos que apresentaram colesterolemia, estes receberam intervenção nutricional.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (15); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);
Integrantes: Daiana Vianna; Ivoneti B. N. de Oliveira (Responsável)
Financiador(es): Centro Universitário Filadélfia-UNIFIL

Áreas de atuação

1. Nutrição
2. Nutrição experimental
3. Bioquímica da Nutrição
4. Nutrição esporte
5. Nutrição em Geriatria

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

2010 Menção Honrosa no Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmaceuticas: MTOR activity is downregulated in skeletal muscle of offspring of rats fed a high fat diet during gestation and lacta., Universidade de São Paulo

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [DOI](#) PANTALEÃO, LUCAS C., TEODORO, GABRIELA F.R., Torres-Leal, Francisco L., VIANNA, D., DE PAULA, TATYANA D., DE MATOS-NETO, EMÍDIO M., TRINDADE, MICHELE C.C., ROGERO, MARCELO M., ROGERO, M. M., BUENO, CARLOS R., Tiraepgui, Julio
Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. Journal of Nutritional Biochemistry. **25**, v.24, p.1340 - 1346, 2013.
2. [DOI](#) TEODORO, G. F. R. VIANNA, D., Torres-Leal, F. L., PANTALEAO, L. C., MATOS-NETO, E. M., Donato, J., Tiraepgui, J.
Leucine Is Essential for Attenuating Fetal Growth Restriction Caused by a Protein-Restricted Diet in Rats.

The Journal of Nutrition (Print). **JCR**, v.142, p.924 - 930, 2012.

3. **Vianna, Daiana^a**, Resende, Gabriela Fulin Teodoro, **Torres-Leal, Francisco Leonardo^a**, Pantaleão, Lucas Carminatti, **Donato, Jose**, TIRAPEGUI, Julio
Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.). **JCR**, v.28, p.182 - 189, 2012.
4. **Torres-Leal, Francisco L^a**, Fonseca-Alaniz, Miriam H, Teodoro, Gabriela FR, de Capitani, Mariana D, **VIANNA, D.**, Pantaleão, Lucas C, **Matos-Neto, Emidio M, Rogero, Marcelo M, Donato, Jose**, TIRAPEGUI, Julio
Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. NUTR METAB. **JCR**, v.8, p.62 - , 2011.
5. **TORRES-LEAL, F.L.**, **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, **CAPITANI, M.**, TIRAPEGUI, Julio
Aspects of the branched chain amino acid leucine in glycemic control and in the insulin resistance. Cadernos de Nutrição (Cessou em 1999. Cont. ISSN 1519-8928 Nutrire (São Paulo)). , v.35, p.131 - 143, 2010.
6. **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, **TORRES-LEAL**, TIRAPEGUI, Julio
Protein synthesis regulation by leucine. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Cessou em 2008. Cont. ISSN 1984-8250 Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences). , v.46, p.29 - 36, 2010.
7. **TEODORO, G. F. R.**, **VIANNA, D.**, **TORRES-LEAL, F.L.**, TIRAPEGUI, Julio
Programação fetal: alterações no ambiente intra-uterino e consequências em longo prazo. Nutrição em Pauta. , v.17, p.39 - 42, 2009.
8. **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, TIRAPEGUI, Julio
Leucina: Novo modulador no processo de síntese protéica?. Nutrição em Pauta. , v.16, p.12 - 15, 2008.

Capítulos de livros publicados

1. TIRAPEGUI, Julio, **VIANNA, D.**, **TEODORO, GABRIELA F.R.**, **CARMINATI, L.**
Leucine and fetal growth In: Branched chain amino in clinical nutrition...1 ed.London : Springer, 2015, v.1, p. 183-196.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **Vianna, Daiana**, LINO, A., TARDIVO, C., RUFFONI, L. D. G., BARBOSA, M. R., SOUZA, M. V. C., Shigemoto, G. E., TIRAPEGUI, Julio
Efeito do Treinamento Resistido e da Restrição Calórica no perfil Lipídico de Ratas Ovariectomizadas In: V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2014
V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício. , 2014. v.V.
2. LINO, A., **Vianna, Daiana**, BARBOSA, M. R., SOUZA, M. V. C., RUFFONI, L. D. G., TARDIVO, C., BORGES, N. T., RODRIGUES, G. J., TIRAPEGUI, Julio, Shigemoto, G. E.
Treinamento Resistido e Restrição Calórica Previnem a Hipertensão Arterial em Ratas Holtzman Ovariectomizadas In: XVIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2014, Londrina.
XVIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. , 2014. v.8. p.8 -
3. **TORRES-LEAL, F.L.**, **FONSECA-ALANIZ, M.**, **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, **CAPITANI, M.**, **PANTALEÃO, L. C.**, **MATOS-NETO, E. M.**, TIRAPEGUI, Julio
Concentrações de adiponectina são aumentadas após suplementação com leucina em ratos obesos por dieta hiperlipídica. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 2010, Águas de Lindóia.
FeSBE. , 2010.
4. **TEODORO, G. F. R.**, **TORRES-LEAL**, **FONSECA-ALANIZ, M.**, **VIANNA, D.**, **PIRES, I.S.**, **CAPITANI, M.**, **CARMINATI, L.**, **DONATO, J.J.**, **ROGERO, M. M.**, **LIMA, F.B.**, TIRAPEGUI, Julio
Effect Of Leucine And Exercise On Fat And Metabolism Of Glucose In Previously Obese Rats. In: American College of Sports Medicine, 2009
Medicine & Science Sports & Exercise. Seattle. , 2009. v.41. p.423 - 423
5. **TEODORO, G. F. R.**, **DONATO, J.J.**, **VIANNA, D.**, **TORRES-LEAL**, TIRAPEGUI, Julio
Effects of bcas supplementation on offspring submitted to maternal protein restriction In: 19th international congress of nutrition, 2009, Bangkok.
Nutrition & Metabolism. London: Medical and scientific publishers, 2009. v.55. p.1 - 758
6. **TORRES-LEAL**, **FONSECA-ALANIZ, M.**, **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, TIRAPEGUI, Julio
Insulin resistant rats make higher deposition of fat with leucine supplementation after exercise In: 19th International Congress of Nutrition, 2009, Bangkok.
Nutrition & metabolism. London: Medical and Scientific Publishers, 2009. v.55. p.1 - 758
7. **TORRES-LEAL**, **FONSECA-ALANIZ, M.**, **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**, **PIRES, I.S.**, **CAPITANI, M.**, **CARMINATI, L.**, **DONATO, J.J.**, TIRAPEGUI, Julio
Leucine associated with exercise reduces body weight and improves the lipid profile of obese rats. In: American College of Sports Medicine, 2009
Medicine & Science Sports & Exercise. Seattle. , 2009. v.41. p.423 - 423
8. **VIANNA, D.**, **DONATO, J.J.**, **TEODORO, G. F. R.**, **TORRES-LEAL**, TIRAPEGUI, Julio
Leucine supplementation attenuates body-fat gain during aging in rats In: 19th International congress of Nutrition, 2009, Bangkok.
Nutrition & Metabolism. London: Medical and Scientific Publishers, 2009. v.55. p.1 - 758
9. **TEODORO, G. F. R.**, **VIANNA, D.**, **OLGUSIKO, D. C. S.**, **CARREIRA, C. M.**
Análise da composição corporal de pacientes portadores do HIV/AIDS em uso de terapia Anti-Retroviral In: Conbran 2006 - XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.
XIX Congresso Brasileiro de Nutrição. , 2006.
10. **VIANNA, D.**, **TEODORO, G. F. R.**
Aspectos tecnológicos do iogurte sabor morango obtido a partir do extrato hidrossolúvel de soja. In: Conbran 2006 - XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo.
XIX Congresso Brasileiro de Nutrição. , 2006.

Demais produções bibliográficas

1. **VIANNA, D.**, **ANJOS, M.**
Perder peso sem praticar exercícios pode prejudicar seu corpo?. Blog. São Paulo:Abril, 2009. (Outra produção bibliográfica)
2. **VIANNA, D.**, **ANJOS, M.**
Qual a sua desculpa para não emagrecer?. Blog. São Paulo:Abril, 2009. (Outra produção bibliográfica)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Aline Cristina de Paula. Efeito da suplementação com whey protein e do exercício físico como estratégia de programa de emagrecimento para indivíduos obesos.. 2015. Monografia (Fisiologia do

Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais

2. Bianca C. Bassoto. EFEITO METABÓLICO DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY POTEIN EM PRATICANTES DE MUSCULAÇÃO. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
3. Sabrina Vigato. EFEITO METABÓLICO DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY POTEIN EM PRATICANTES DE MUSCULAÇÃO. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
4. Bruna Borges. Levantamento de indicação de Suplementos para alunos de uma academia da cidade de Muzambinho/MG.. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
5. Marcio Bueno. Levantamento de indicação de Suplementos para alunos de uma academia da cidade de Muzambinho/MG.. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
6. Rafael Sakai Zargni. RESPOSTA HIPERTRÓFICA EM DIFERENTES HORÁRIOS DE SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEIN.. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
7. Karla Ramos. USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR FREQUENTADORES DE ACADEMIAS DE BOA ESPERANÇA - MG. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
8. Sônia Monteiro. USO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR FREQUENTADORES DE ACADEMIAS DE BOA ESPERANÇA - MG. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
9. Carlos Roberto Martins Junior. O benefício do treinamento resistido isolado e associado ao Whey protein em idosos com sarcopenia: revisão da literatura.. 2013. Monografia (Especialização em Fisiologia do Exercício: Fundame) - Universidade Federal de São Carlos

Orientações e supervisões em andamento

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Renata Messias de Almeida. O PAPEL DO ÁCIDO ASCÓRBICO E DO ALFA TOCOFEROL COMO ANTIOXIDANTE EM PRATICANTES DE MUSCULAÇÃO DO SEXO FEMININO. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais
2. Mariane Duarte Beraldo Martins dos Santos. O PAPEL DO ÁCIDO ASCÓRBICO E DO ALFA TOCOFEROL COMO ANTIOXIDANTE EM PRATICANTES DE MUSCULAÇÃO DO SEXO FEMININO. 2015. Monografia (Fisiologia do Exercício, Nutrição e Suplementação) - ENAF- Desenvolvimento Serviços Educacionais

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 14/07/2015 às 10:02:57.