

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

Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação,
homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da
insulina de ratos destreinados

João Alfredo Bolivar Pedroso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2013

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

Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação,
homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da
insulina de ratos destreinados

João Alfredo Bolivar Pedroso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

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

<p>Pedroso, João Alfredo Bolivar</p> <p>P372e Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação, homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da insulina de ratos destreinados / João Alfredo Bolivar Pedroso. -- São Paulo, 2013. 80p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando</p> <p>1. Esporte : Nutrição 2. Bioquímica nutricional I. T. II Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.</p> <p>641.1 CDD</p>

João Alfredo Bolivar Pedroso

Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação,
homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da
insulina de ratos destreinados

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2013.

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.”
Aristóteles

Dedicatória

À minha mãe, Fátima, por me ensinar a preciosidade do conhecimento: nosso único bem, que ninguém jamais poderá roubar.

Ao meu pai, Vicente. Meu maior exemplo de trabalho, dedicação e perseverança.

À minha companheira, Carol, pelo amor, pelo carinho e por estar ao meu lado sempre; incentivando-me a seguir em frente: seja qual for o desafio.

Agradecimentos

Este trabalho é resultado de uma longa jornada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer, muitas vezes, não é tarefa fácil. Portanto, para não correr risco de 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 Deus: muito obrigado pelo que me deste e pelo que me dás. Obrigado pela proteção, por me mostrar o caminho do bem e por colocar em minha vida pessoas admiráveis, que me ajudam a me tornar uma pessoa melhor. Pelo Teu amor, obrigado, Senhor!

A minha mãe, Fátima Sincos, pelo seu esforço em minha educação. Pelas inúmeras vezes que ouvi a afirmação: “Sem estudo, nós não chegamos a lugar nenhum”. Durante minha infância, não dava muita atenção para os estudos, mas você, com muita perseverança, paciência e amor, conseguiu me mostrar a importância de adquirir uma formação profissional. Se hoje estou seguindo o caminho da vida acadêmica, foi porque você me ensinou, com bastante glória, a magnitude da sabedoria.

Ao meu pai, Vicente Pedroso. Como disse acima, meu maior exemplo de trabalho, dedicação e perseverança. Apesar da distância, foi e continua sendo um pai muito amoroso e bem-humorado. Grandezas que, certamente, contribuíram para minha formação como homem e, sem dúvida, servirão como modelo do pai que serei para meus filhos. Muito obrigado!

Ao meu irmão, José Antônio Pedroso, a pessoa mais inteligente e determinada que eu conheço. Obrigado pelo seu companheirismo fraternal e pela sabedoria. Um dos principais responsáveis na minha escolha em ser nutricionista. Ainda me lembro, quando éramos jovens, enquanto eu estava brincando no quarto, você estava dando aula particular para alguns alunos do colégio. Esse quadro ainda está em minha memória e, certamente, contribuiu (novamente) na minha decisão profissional.

A minha companheira, Carolina Gonçalves. Por estar ao meu lado sempre, me ajudando e incentivando. Obrigado por seu amor e por sua companhia. Pela paciência, pelo carinho e pelo aconchego nos períodos conturbados do mestrado. Você me faz querer ser uma pessoa melhor. Nosso dia irá chegar, mas agora é preciso lutar para conseguirmos conquistar tudo aquilo que sonhamos junto. Não dá para descrever aqui quão importante você é em minha vida. Minha especial e sincera gratidão e meu respeito.

Ao grupo GPEMENE e, em especial, ao Prof. Dr. Edilson Serpeloni Cyrino, por ter sido o grande responsável pelo meu despertar na carreira acadêmica e científica.

Ao Prof. Dr. Julio Tirapegui, meu orientador, por confiar em mim e por ajudar no meu crescimento. Pelo seu excelente exemplo de profissional na área de nutrição e atividade física. Mas, mais do que isso: obrigado pelo exemplo de respeito e educação que devemos ter com os outros, seja quem for. A minha mais profunda admiração, o meu respeito e minha eterna gratidão.

À Ivanir, técnica do laboratório: obrigado pela sua ajuda e pelos ensinamentos. Obrigado pelos momentos nos quais “dividimos” a bancada, pelas risadas e pelos cafezinhos tomados na copa. Foram momentos de trabalho. Mas, alguns, de bastante descontração, que, certamente, guardarei com muito carinho em minha memória.

Aos nossos alunos de iniciação científica: Daniel, Rodrigo e Laís. Que nos ajudaram muito durante a realização do experimento. Que participaram com bastante afinco nas “simples” três horas diárias que passamos no biotério durante quatorze semanas para a realização desse trabalho.

Ao amigo Emídio Matos, meu “tutor” durante o mestrado. Obrigado pela sua paciência, seus ensinamentos e sua ajuda na realização das análises. Obrigado pela preciosa colaboração “intelectual” e “braçal” durante esses dois anos e meio. Sem dúvida nenhuma, foi muito importante para o desenvolvimento desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À amiga e parceira de trabalho, Luciana Nishimura. Eu simplesmente não tenho palavras para expressar a tamanha importância que você teve na realização desse trabalho. Sempre pronta em colaborar no que fosse preciso e quando fosse necessário. Com toda certeza, sem a sua participação, essa pesquisa não seria possível. Muito obrigado pela sua ajuda, por seus ensinamentos e por sua companhia durante a realização do meu mestrado.

Aos demais colegas do laboratório: Michele, Mari, Andrea, Dai, Vanessa, Jaque e Vinicius. Por estarem dispostos em ajudar, sempre que fosse preciso.

Às “marceletes” Tati e Moniquinha, pela convivência durante as cansativas análises de *Western Blotting*. A troca de informação com vocês foi muito importante para o desenvolvimento dessa análise.

Aos colegas de outros laboratórios: Leo, Lucas e LiLi, pela colaboração nas análises e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do bloco 14: meus sinceros agradecimentos.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, e ao CNPq, pela bolsa: a pesquisa não seria viável sem o apoio destas instituições. Meus agradecimentos.

Por fim, peço minhas sinceras desculpas àqueles que porventura eu tenha esquecido de mencionar, dada a emoção do momento.

RESUMO

Pedroso, J. A. B. **Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação, homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da insulina de ratos destreinados.** 2013. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Diversos estudos demonstram que os benefícios induzidos pelo exercício físico são revertidos após a interrupção do mesmo. Essa interrupção, também conhecida como destreinoamento físico, leva ao aumento da massa corporal, ganho de massa adiposa e resistência à insulina. Apesar dessas evidências, pouca atenção é destinada para investigação de estratégias que possam atenuar esse quadro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da restrição calórica sobre sensibilidade à insulina e os marcadores de inflamação no tecido adiposo epididimal de ratos destreinados. A amostra foi composta por 32 ratos Sprague-Dawley, machos e adultos. Inicialmente, os animais foram distribuídos em 2 grupos: Controle (CON) e Treinamento (TREIN), animais que foram submetidos ao treinamento em esteira ergométrica durante 8 semanas. Em seguida os animais TREIN foram redistribuídos em três grupos: Um grupo foi constituído por animais que continuaram o programa de treinamento físico (TF) por 6 semanas e mantidos ao acesso de ração *ad libitum* (TREIN). Os outros dois grupos tiveram o TF interrompido e foram mantidos ao acesso de ração *ad libitum* (DT) ou a restrição calórica de 30% (DTRC) por 6 semanas. Os animais do grupo CON continuaram o experimento, por mais 6 semanas, sem realizar qualquer tipo de exercício físico. A mensuração da massa corporal e o teste oral de tolerância à glicose foram realizados na oitava e na décima terceira semana de experimento. A partir disso, foi calculado o delta percentual da massa corporal ($\Delta\%MC$) e da área sob a curva glicêmica ($\Delta\%ASC$). Após 14 semanas de experimento, os animais foram eutanasiados para determinação da composição corporal. Também, foram analisadas proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina (PKB), proteínas e adipocinas envolvidas no processo inflamatório (PKC; IKK-beta; JNK; TNF- α ; leptina; adiponectina) O grupo DTRC apresentou valores significativamente menores para $\Delta\%MC$, $\Delta\%ASC$ e gordura relativa comparado ao DT Além disso, os valores encontrados no grupo DT foram estatisticamente maiores em comparação ao TREIN. Por outro lado, a massa livre de gordura relativa foi estatisticamente menor no grupo DT em contraste aos grupos DTRC e TREIN. Baseados nesses resultados, conclui-se que a restrição calórica foi capaz de atenuar o ganho de peso corporal e massa adiposa, além de evitar a diminuição da sensibilidade à insulina e da massa livre de gordura após 6 semanas de destreinoamento físico.

Palavras-chave: Destreinoamento físico. Restrição Calórica. Tecido Adiposo.

ABSTRACT

Pedroso, J. A. B. **Effect of caloric restriction on markers of inflammation, glycemic homeostasis and proteins involved in insulin signaling pathway in untrained rats.** Master Dissertation Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2013.

Several studies show that the benefits induced by exercise are reversed after cessation it. This interrupt, also known as physical detraining leads to increased body weight, body mass gain and insulin resistance. Despite this evidence, little attention is directed to investigate strategies to increase this situation. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of calorie restriction on insulin sensitivity and inflammation markers in epididymal adipose tissue of rats untrained. The sample consisted of 32 male Sprague-Dawley male and adult. Initially, the animals were divided into 2 groups: control (CON) and Training (TREIN), animals underwent training on a treadmill for 8 weeks. Then TREIN animals were divided in three groups: One group was composed of animals that continued the program of physical training (PT) for 6 weeks and maintained access to food ad libitum (TREIN). The other two groups had stopped and the TF were maintained ad libitum access to food (TD) or 30% caloric restriction (DTRC) for 6 weeks. The animals in the CON group continued the experiment for another 6 weeks, without performing any type of exercise. The measurement of body mass test and oral glucose tolerance were carried out in the eighth and the thirteenth week of the experiment. From this, we calculated the percentage of body mass delta ($\Delta\%$ MC) and the area under the glucose curve ($\Delta\%$ AUC). After 14 weeks, the animals were euthanized for determination of body composition. Also, we analyzed the proteins involved in insulin signaling pathway (PKB) and protein adipokines involved in inflammatory pathway (PKC; IKK-beta; JNK, TNF- α , leptin, adiponectin) DTRC group showed significantly lower values for $\Delta\%$ MC, $\Delta\%$ AUC and fat on the TD compared Furthermore, the values DT group were significantly higher compared to TREIN. Moreover, the relative fat-free mass was lower in the DT group in contrast to groups and DTRC TREIN. Based on these results, it is concluded that caloric restriction was able to attenuate the gain in body weight and fat mass, in addition to preventing the decrease in insulin sensitivity and fat free mass after 6 weeks detraining physical.

Keywords: Physical detraining. Caloric Restriction. Adipose Tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho Experimental.....	29
Figura 2	Evolução do desempenho no TEM durante o estudo.....	39
Figura 3	Massa corporal final dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.....	40
Figura 4	Variação relativa da massa corporal (8 ^a e 14 ^a semanas).....	41
Figura 5	Ganho percentual do peso semanal.....	42
Figura 6	Massa e composição química da carcaça dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.....	43
Figura 7	Consumo médio de ração semanal dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC durante a 9 ^a e a 14 ^a semanas de experimento.....	45
Figura 8	Consumo total de ração dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC entre a 9 ^a e a 14 ^a semanas de experimento.....	45
Figura 9	Média do Coeficiente de Eficiência Metabólica dos grupos SED, TREIN e DT durante a 9 ^a e a 14 ^a semanas de experimento.....	46
Figura 10	Área sob a curva e delta percentual do teste oral de tolerância à glicose realizado na 8 ^a e na 13 ^a semanas.....	48
Figura 11	Correlação entre área sob a curva da 13 ^a semana e Gordura dos animais dos grupos SED, TREIN, DT, DTRC.....	49
Figura 12	Expressão e fosforilação das proteínas JNK, IKK e PKC no tecido adiposo EPI dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.....	50
Figura 13	Expressão e fosforilação da proteína Akt no tecido adiposo EPI dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.....	51

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 8 semanas de experimento.....	38
Tabela 2	Coxins adiposos RET e EPI dos grupos SED, TREIN, DT, DTRC após 14 semanas de experimento.....	44
Tabela 3	Glicemia de jejum (mg/dl) na semana 7 e na semana 13 e $\Delta\%$ dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC.....	47
Tabela 4	Concentrações séricas de leptina, ácidos graxos livres, TNF-alfa e adiponectina dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.....	49

LISTAS DE ABREVIATURA

TF	Treinamento Físico
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
IRS	substrato do receptor de insulina
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
AKT	proteína quinase B
DF	destreinamento físico
VO _{2máx}	consumo máximo de oxigênio
TAB	tecido adiposo branco
LPL	lipase de lipoproteínas
TNF- α	fator de necrose tumoral
JNK	c-jun-N-terminal quinase
IKK	proteína quinase inibidora do I κ B
IL-6	Interleucina 6
GLUT4	transportadora de glicose no músculo esquelético
HOMA _{IR}	teste de sensibilidade à insulina
RC	Restrição Calórica
IMC	Índice de massa corporal
MCP1	proteína quimiotática de monócitos
IR	Receptor de insulina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
AIN-93M	American Institute of Nutrition – 1993 para ratos adultos
TREIN	Treinamento
DT	Destreinado
DTRC	Destreinado restrição calórica
TEM	teste de esforço máximo
RET	retroperitoneal
EPI	epididimal
OGTT	Teste Oral de tolerância à glicose
TEMED	Tetrametiletilenediamina
MLG	massa livre de gordura
%MLG	Percentual de massa livre de gordura
EM	coeficiente de eficiência metabólica
UCP	proteínas desacopladoras mitocondriais
%G	Percentual de gordura
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos

DAG	diacilgliceróis
TGL	triacilglicerol
AGNE	Ácidos graxos não estereificados
ASC	Área sob a curva
TAB	Tecido Adiposo Branco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Animais.....	28
4.2. Desenho experimental	28
4.3. Ração.....	29
4.3.1. Ração restrição calórica.....	29
4.4. Determinação da massa corporal e do consumo da ração.....	31
4.5. Protocolo de treinamento físico.....	31
4.6. Teste de esforço máximo.....	31
4.7. Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....	32
4.8. Parâmetros analisados.....	32
4.8.1. Parâmetros avaliados ao longo do período do TF e DF.....	32
4.8.2. Composição química da carcaça.....	33
4.8.3. Parâmetros teciduais.....	33
4.8.4. Parâmetros séricos.....	33
4.8.5. Proteínas totais e fosforiladas.....	33
4.9. Determinação da composição corporal.....	33
4.10. Determinações bioquímicas.....	34
4.10.1. Parâmetros séricos.....	34
4.10.2. Teste oral de tolerância à glicose	34
4.11. Parâmetros teciduais.....	34
4.12. Parâmetros biomoleculares.....	34
4.12.1. <i>Western Blotting</i>	34
4.12.1.1. Preparo do gel poliacrilamida.....	35
4.12.1.2. Preparo do lisado de proteínas para SDS- PAGE e “Western blotting”	35
4.12.1.3. Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose).....	35
4.12.1.4. Sondagens das proteínas com anticorpos	38

4.12.1.5. Revelação com sistema quimioluminescente.....	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1. Redistribuição dos grupos após 8 semanas de treinamento físico	38
6.2. Desempenho no teste de esforço máximo (TEM) durante o experimento.....	39
6.3. Massa corporal e ganho de peso.....	40
6.4. Composição corporal	42
6.4.1.1. Gordura e massa dos coxins adiposos.....	42
6.4.1.2. Massa livre de gordura	44
6.5. Consumo de ração.....	44
6.6. Coeficiente de eficiência metabólica.....	46
6.7. Glicemia em jejum e teste oral de tolerância à glicose.....	47
6.8. Concentrações séricas de citocinas e ácidos graxos não esterificados.....	40
6.9. Expressão proteica no tecido adiposo EPI.....	50
7. DISCUSSÃO.....	52
8. CONCLUSÃO.....	67
REFERENCIAS	68
ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, já é bem documentado na literatura que o treinamento físico (TF) promove adaptações positivas na composição corporal (ARCIERO *et al.*, 2006) e nos sistemas cardiovasculares e metabólicos (VOLAKLIS *et al.*, 2006). Por isso, o TF tem sido recomendado como excelente medida de tratamento para prevenção e/ou para controle de diversos tipos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares, por diferentes associações de saúde no mundo.

No contexto da resistência à insulina, pesquisas apontam que apenas 10 dias de TF foram capazes de promover redução dos depósitos de gordura corporal, bem como aumento da sensibilidade à insulina em sujeitos obesos (ARCIERO *et al.*, 1999). Além disso, estudos recentes demonstram existir uma relação dose-resposta entre o TF e a melhora na sensibilidade à insulina; desta maneira, a intensidade do exercício físico é capaz de melhorar significativamente a ação desse hormônio (DUBÉ *et al.*, 2011).

Do ponto de vista biomolecular, diversos autores demonstram o efeito do TF sobre o aumento da expressão de proteínas intracelulares envolvidas na via de sinalização da insulina (LUCIANO *et al.*, 2002; TORRES-LEAL *et al.*, 2009; FROSIG *et al.*, 2007). Alguns estudos observaram importante melhora na sensibilidade desse hormônio, via fosforilação no resíduo tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS)-2, resultando no aumento da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), uma enzima considerada chave na captação de glicose (HOWLETT *et al.*, 2002). Ademais, o exercício físico promove aumento na fosforilação da proteína quinase B (Akt) e, desta forma, estimula a translocação proteína transportadora de glicose (GLUT)-4 para a membrana celular, facilitando, assim, o transporte da glicose para o meio intracelular (PERES *et al.*, 2005).

As evidências experimentais reportam que o TF afeta a ação da insulina tanto no tecido muscular esquelético quanto no tecido hepático, bem como pode causar aumento da captação de glicose pelos adipócitos (RODNICK *et al.*, 1987; PERES *et al.*, 2005). Portanto, torna-se clara a participação do TF na melhora da sensibilidade à insulina em diversos compartimentos corporais.

Em contrapartida, atletas e praticantes de exercícios físicos frequentemente são submetidos à interrupção repentina do TF, muitas vezes causada por lesões (ou por algum outro tipo de injúria), por período de férias, por transição da fase do ciclo de TF ou, até mesmo, pelo término da carreira esportiva. Adicionalmente, a interrupção temporária ou definitiva do TF acarreta em reversões parciais ou completas das adaptações adquiridas ao longo do tempo.

Essas alterações nas capacidades fisiológicas causadas pela redução ou pela interrupção do TF são conhecidas como destreinamento físico (DF) (MUJIK & PADILLA, 2000). A literatura define DF como a redução permanente, temporária ou, ainda, a completa retirada dos estímulos do TF, que pode acarretar na perda de adaptações anatômicas, fisiológicas e psicológicas, resultando na completa diminuição do rendimento atlético (FAIGENBAUM *et al.*, 1996). Portanto, é extremamente importante identificar os efeitos e entender os mecanismos associados às mudanças fisiológicas ocorridas no período de DF.

Dentre as alterações ocorridas em virtude do DF, ganha destaque na literatura o comprometimento na aptidão física, devido: a redução na capacidade cardiorrespiratória, através do declínio do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2m\acute{a}x}$); a redução no volume sanguíneo; as perdas nas adaptações dos sistemas metabólicos; a redução das concentrações de glicogênio muscular; e o declínio significativo da atividade de enzimas oxidativas, causando redução na produção de ATP mitocondrial (MUJIK & PADILLA, 2000). O DF é capaz de reduzir a força muscular, a agilidade, a flexibilidade e o balanço estático, comprometendo a qualidade de vida (BOCALINI *et al.*, 2010).

Além disso, pesquisas têm apontado que o DF acarreta mudanças drásticas na composição corporal. Petibois *et al.* (2004) demonstraram que o DF foi capaz de aumentar a quantidade de gordura corporal (70 %), acompanhado do aumento significativo no índice de massa corporal (IMC) e da redução na massa corporal magra em atletas de *endurance*. O DF foi capaz, também, de aumentar (13 %) os níveis séricos de LDL e, concomitantemente, reduzir (19 %) os níveis de HDL colesterol. Outra pesquisa, desenvolvida com atletas de natação, mostrou que curto período de DF (5 semanas) proporcionou aumento na massa corporal (1,3 %), na gordura corporal (7,7 %) e redução na taxa metabólica de repouso (7 %) (ORMSBEE & ARCIERO 2012). Por fim, Liu *et al.* (2008) constataram, em atletas de caiaque, que apenas 4 semanas de DF resultou no aumento da circunferência abdominal (+1,73 cm) associado com a redução da massa corporal (1.075 g) e do IMC. Os autores especularam que o aumento da circunferência abdominal, sem a elevação da massa corporal, ocorreu devido ao acúmulo de gordura durante o período de DF, associado à redução de massa muscular esquelética.

Resultados semelhantes também são encontrados em trabalhos desenvolvidos com animais, mostrando que a inatividade física, após 21 dias de corrida voluntária, expandiu os depósitos de gordura no tecido adiposo epididimal (48 %), comparado com o grupo que não teve acesso à prática de atividade física voluntária (LAYE *et al.*, 2007). Adicionalmente, Lambert *et al.* (1994) reportaram que o DF foi capaz de causar aumento de 23 % no diâmetro de adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) epididimal. Estudo recente, desenvolvido em nosso laboratório, demonstrou que 6 semanas de DF promoveu rápido

ganho na massa corporal e, concomitantemente, aumento na adiposidade (MATOS-NETO, E.M. 2011)

O rápido ganho de peso e massa adiposa no período de cessação do TF sugere que o DF não é acompanhado pela redução espontânea do consumo calórico. Como consequência, promove o estado de balanço energético positivo e, assim, favorece o aumento dos estoques energéticos em forma de triacilgliceróis no TAB. Estudos suportam essa hipótese tanto em humanos quanto em animais. Stubbs *et al.* (2004) relataram que a interrupção do TF (comparado com os indivíduos que continuaram o exercício físico) não casou redução no consumo calórico. Como resultado, após 7 dias de atividades sedentárias, os sujeitos tiveram acúmulo de 6.200 kcal, levando a ganho de peso de 0,9 Kg. Da mesma forma, Kump & Booth (2005) demonstraram que, mesmo após a cessação do TF, os animais continuaram consumindo maior quantidade de ração diária (+ 10,8 %), comparado com o grupo controle. Por fim, Applegate *et al.* (1984) relataram que o DF aumentou o consumo de ração (+ 25 %), comparado com o de ratos sedentários.

Por outro lado, evidências científicas demonstram que o ganho de peso e o aumento de massa adiposa nesse período não podem ser atribuídos somente às alterações na ingestão energética. Nesse contexto, Laye *et al.* (2007) observaram, em roedores, que, independentemente do excesso de caloria consumida, a interrupção da prática de atividade física foi capaz de promover o aumento da gordura abdominal. Além disso, Petibois *et al.* (2004), apesar de terem encontrado alterações deletérias na composição corporal durante o período de DF, não observaram qualquer diferença nos hábitos alimentares entre os sujeitos. Portanto, alguns autores sugerem que uma possível desordem metabólica explicaria o contínuo ganho de gordura corporal após a cessação do TF. Dessa maneira, provavelmente, o DF aumente a atividade da enzima lipase de lipoproteínas (LPL) no tecido adiposo, lipogênese e, subsequentemente, o aumento da adiposidade (SIMSOLO *et al.*, 1993; APPLGATE *et al.*, 1984).

A preocupação com o aumento da massa adiposa, após a interrupção do TF, se justifica pelo fato de que pesquisas recentes têm mostrado uma nova linha de entendimento sobre a função do TAB, considerando não só sua capacidade de armazenamento energético, mas também sua participação na regulação de diversos processos metabólicos e hormonais. Nesse aspecto, o TAB se comunica com órgãos centrais e periféricos através da síntese e da secreção de diversas substâncias bioativas, também conhecidas como adipocinas. A produção desregulada de algumas adipocinas, principalmente em situações de excesso da massa adiposa, vem sendo relacionada com diversos tipos de enfermidades, tais quais anormalidades na homeostase glicêmica, elevação na concentração de triacilgliceróis plasmáticos, redução de lipoproteínas de alta densidade, além de contribuir

para o surgimento de doenças, como diabetes tipo II e síndromes cardiovasculares (LAFONTAN & GIRARD, 2008; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

Dentre as proteínas secretadas pelo TAB, destaca-se o fator de necrose tumoral (TNF)- α , por estar envolvido no processo de resistência à insulina. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos, tendo papel central em doenças inflamatórias e autoimunes (OUCHI *et al.*, 2011). Em resumo, estudos com animais mostraram a expressão aumentada dessa citocina pelo TAB em obesos e diabéticos tipo II (HOTAMISLIGII *et al.*, 1993).

A literatura aponta a participação do TNF- α na ativação de mediadores envolvidos no processo de resistência à insulina. Em especial, o TNF- α ativa proteínas inflamatórias conhecidas como JNK (c-jun-N-terminal quinase) e IKK (proteína quinase inibidora do I κ B), induzindo a fosforilação em serina dos substratos dos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2) e, assim, inibindo a via de sinalização desse hormônio (LORENZO *et al.*, 2008). Por outro lado, o bloqueio da sinalização do TNF- α em animais obesos levou à melhora da sensibilidade à insulina e esta melhora foi associada com a alteração da sinalização da insulina no tecido muscular esquelético e no TAB (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993).

A interleucina (IL)-6 é outra citocina pró-inflamatória, sintetizada pelo TAB, principalmente o visceral, além de ser sintetizada em outros tecidos. Assim como o TNF- α , a IL-6 também está relacionada com processos inflamatórios, resistência à insulina e adiposidade corporal. Nesse sentido, a IL-6 leva à redução na captação de glicose pelo músculo esquelético, além de alterar a sinalização da insulina, através da redução na expressão do IRS-1 (GOMEZ-AMBROSI *et al.*, 2008).

A leptina é outra proteína produzida pelo TAB, com papel importante no controle do apetite, através de mecanismos envolvidos com o sistema nervoso central, gasto energético e adiposidade (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Nesse aspecto, a administração de leptina em humanos com deficiência congênita induziu a perda de peso corporal, através da redução do consumo alimentar e do aumento do gasto energético (FAROOQI *et al.*, 2002).

Contudo, estudos apontam uma correlação positiva entre os níveis de circulação de leptina sérica e a quantidade de gordura corporal. Dessa forma, por mecanismos ainda poucos esclarecidos, o excesso de massa adiposa promove resistência à leptina no sistema nervoso central, sem qualquer influência no controle alimentar e, por conseguinte, pode ocasionar hiperfagia, redução no gasto energético e aumento da massa corporal (RESELAND *et al.*, 2001).

Do mesmo modo, o TAB é capaz de secretar algumas proteínas de caráter anti-inflamatório, como a adiponectina. Estudos implicam os efeitos dessa adipocina principalmente no aumento da sensibilidade à insulina (GOMEZ-AMBROSI *et al.*, 2008). Neste contexto, a administração de adiponectina em camundongos diabéticos reduziu a

hiperglicemia e melhorou a atividade da insulina. E, quando injetado em camundongos obesos, aumentou a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, além de reduzir as concentrações plasmáticas de glicose, ácidos graxos e triacilgliceróis (OUCHI *et al.*, 2011). Por outro lado, em adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo de ratos, *in vitro*, a redução de 60 % na expressão de adiponectina resultou em aumento significativo da resistência à insulina (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

Apesar de os adipócitos serem os principais produtores de adiponectina, o acréscimo do TAB está associado com a redução dessa proteína, provavelmente devido à supressão da transcrição desta adipocina nas células adiposas, causada por algumas proteínas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (TILG & MOSCHEN, 2008). A redução plasmática dessa proteína vem sendo considerada fator de risco independente para diabetes tipo II; além disso, alguns autores sugerem a concentração sérica desse hormônio como um possível marcador de enfermidades relacionadas à síndrome metabólica (SUZUKI *et al.*, 2005).

Ademais, outra adipocina, conhecida como proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, vem ganhando destaque na literatura, devido a sua característica quimioatrativa, com capacidade de atrair monócitos que, por sua vez, se diferenciam em macrófagos no TAB. Uma vez nesse tecido, os macrófagos aumentam a síntese e a secreção de proteínas, como TNF- α e IL-6, favorecendo a resposta inflamatória e a resistência à insulina. Neste sentido, estudos prévios mostraram que a expressão aumentada de MCP-1 no TAB ou até mesmo quando encontrado em alta concentração na circulação sanguínea, contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina (KANDA *et al.*, 2006; TATEYA *et al.*, 2010). Por outro lado, quando os autores inibiram a expressão de MCP-1, em animais geneticamente modificados, houve redução na infiltração de macrófagos no TAB e, como resultado, melhora na sensibilidade à insulina, além de atenuação no acúmulo de gordura no fígado (KANDA *et al.*, 2006). Em resumo, o quadro 1 expõe as principais moléculas sintetizadas pelo TAB, bem como seus respectivos efeitos biológicos.

Quadro 1 - Principais moléculas secretadas pelo TAB e suas respectivas funções.

Substância	Efeito biológico
Leptina	✓ Controle do apetite através do sistema nervoso central
	✓ Gasto energético
TNF- α	✓ Aumento da resistência à insulina

Adiponectina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento da sensibilidade à insulina ✓ Favorecimento da oxidação de ácidos graxos ✓ Atenuação da progressão da aterosclerose
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ação Lipolítica ✓ Redução da sensibilidade à insulina, ✓ Função depende da origem e do tecido alvo
MCP-1	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Infiltração de macrófagos no TAB ✓ Redução da captação de glicose ✓ Resistência à insulina
PAI-1	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inibição da ativação do plasminogênio ✓ Associação com doenças cardiovasculares e diabetes tipo II
Resistina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Promoção de resistência à insulina e inflamação através da secreção de TNF-α e IL-6 pelos macrófagos
PCR	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Associação com obesidade e diabetes tipo II

Adaptado de FONSECA-ALANIZ, et al., 2007

Apesar da forte evidência de que o DF é capaz de aumentar a massa adiposa e, paralelamente, aumentar a participação do TAB na produção desregulada de adipocinas pró e anti-inflamatória sobre a resistência à insulina, em situações de excesso de peso corporal, poucos estudos foram destinados a investigar essa associação. Desse modo, as pesquisas apontam que o DF é capaz de aumentar a concentração de leptina (LIU *et al.*, 2008;

FATOUROS *et al.*, 2005) e, concomitantemente, reduzir as concentrações de adiponectina plasmática (WOO JINHEE *et al.*, 2012; FATOUROS *et al.*, 2005). Além disso, embora o TF fosse capaz de reduzir a concentração plasmática de glicose, esse benefício foi revertido pelo DF, acompanhado pela redução no teste de sensibilidade à insulina ($HOMA_{IR}$) (FATOUROS *et al.*, 2005).

Com relação aos efeitos do DF sobre a ação da insulina, estudos demonstram que apenas 10 dias de interrupção do TF foram capazes de reduzir a sensibilidade desse hormônio em sujeitos fisicamente ativos (KING *et al.*, 1988), bem como em atletas de *endurance* (ARCIERO *et al.*, 1998). Adicionalmente, 6 dias de DF, em corredores, reduziu a ação da insulina e, também, causou decréscimo nos níveis da proteína transportadora de glicose no músculo esquelético (GLUT4) (VUKOVICH *et al.*, 1996). Em roedores, Kump & Booth (2005) relataram que dois dias de interrupção de atividade física espontânea promoveram diminuição no conteúdo da proteína GLUT4 no músculo esquelético, além de reduzirem a ativação da via de sinalização da insulina, através da redução da fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) e AKT. Enquanto que estudo desenvolvido em nosso laboratório mostrou que, apesar de os benefícios do TF sobre a ação da insulina serem preservados após 6 semanas de DT, a interrupção do TF foi marcada pela redução da concentração de leptina sérica e ainda promoveu a condição pró-inflamatória, sobretudo quando avaliada a razão IL-10/TNF- α ; além de modular, sobre o tecido adiposo epididimal, a atividade de algumas proteínas intracelulares com ação pró-inflamatória (MATOS-NETO, E.M. 2011).

Portanto, apesar de os mecanismos moleculares não estarem totalmente esclarecidos, é bastante claro que o DF causa alterações no comportamento morfológico, não só em humanos, mas também em animais e, dessa forma, promove ganho de peso corporal e aumento repentino na massa adiposa, acompanhado por redução na massa corporal magra. Ademais, o DF atua sobre concentrações séricas de adipocinas, além de resultar no comprometimento de proteínas intracelulares envolvidas na sinalização de insulina.

Por outro lado, apesar das fortes evidências na literatura demonstrando os efeitos deletérios do DF, a investigação de tratamentos que possam atenuar esse quadro tem ganhado pouca atenção. Portanto, acreditamos que seja extremamente necessário buscar alternativas que consigam reduzir as consequências causadas pelo DF.

No ponto de vista nutricional, estratégia conhecida como restrição calórica (RC) – ingestão de calorias abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição – tem sido indicada como excelente medida para estender a longevidade em diferentes espécies, incluindo levedura, moscas, vermes, peixes e roedores (FONTANA & KLEIN, 2007).

Estudos conduzidos com animais encontraram que a RC pode aumentar a longevidade através da prevenção ou do atraso de ocorrência de DCNT, incluindo diabetes tipo II, aterosclerose, doenças autoimunes, obesidade e cânceres. Além disso, a RC diminui a neurodegeneração no cérebro e melhora a neurogênese em modelos de animais com doenças como Alzheimer e Parkinson (MATTSON *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2006).

Os mecanismos biológicos benéficos envolvidos pelo efeito da RC ainda são poucos elucidados. Entretanto, pesquisas com animais experimentais indicam algumas hipóteses, como: (1) redução na produção de espécies reativas de oxigênio e modulação do sistema antioxidante endógeno, o qual diminui o estresse oxidativo e os danos teciduais induzidos por radicais livres; (2) redução nas concentrações sanguíneas de tri-iodotironina e atividade do sistema nervoso simpático, resultando em diminuição da temperatura corporal e taxa de gasto energético de repouso; (3) proteção contra o envelhecimento associado à deterioração do sistema imune e; (4) aumento na expressão de proteínas chaperonas, evitando erros na configuração de algumas proteínas e, assim, reduzindo o risco de doenças conformacionais, como Parkinson e Alzheimer. Além disso, pesquisas demonstraram o efeito da RC sobre a modulação na concentração de citocinas inflamatórias, resultando em redução da inflamação sistêmica e de baixa intensidade (FONTANA & KLEIN, 2007).

Neste aspecto, a RC foi capaz de reduzir o processo inflamatório no músculo esquelético, através da redução nas concentrações de TNF- α e IL-6 e expressão na forma ativa da JNK em ratos diabéticos. Foram observadas, também, redução nas concentrações sanguíneas de leptina, acompanhada pelo acréscimo na concentração de adiponectina e pela concomitante melhora na sensibilidade à insulina (CRISÓSTOMO *et al.*, 2010). Em outro estudo, também em animais experimentais, a RC resultou na perda de peso corporal e na redução na concentração plasmática de TNF- α e IL-6, além do aumento de haptoglobina – proteína com propriedades anti-inflamatória – atenuando os efeitos relacionados com a inflamação sistêmica e de baixa intensidade (UGOCHUKWU *et al.*, 2007).

Estudos realizados com humanos demonstram resultados similares aos encontrados com modelos experimentais. Uma pesquisa realizada com coreanas com IMC maior que 23 kg/m² verificou que a RC reduziu significativamente as concentrações circulantes de TNF- α e leptina, acompanhada pelo aumento de adiponectina (LEE *et al.*, 2010). Em sujeitos obesos e com diabetes tipo II, a RC reduziu a massa corporal e melhorou o perfil inflamatório, através do decréscimo dos níveis circulantes de algumas proteínas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF- α e proteína C reativa) (MRAZ *et al.*, 2011).

O mecanismo molecular envolvido no efeito da RC sobre a modulação da inflamação, no entanto, é pouco conhecido. Tem sido proposta a hipótese da redução da gordura corporal, em especial da diminuição na massa adiposa visceral (BARZILAI *et al.*,

1998). Neste aspecto, a perda de peso corporal mediada pela RC reduziu a infiltração e a diferenciação de macrófagos no TAB e, portanto, diminuiu os marcadores inflamatórios (FONTANA, 2009). É importante ressaltar que a RC tem efeito benéfico tanto em humanos quanto em ratos não obesos, indicando que o decréscimo da adiposidade não deve ser o único mediador dos efeitos positivos relacionados à RC (SMITH, *et al.*, 2004; REDMAN, *et al.*, 2008).

Além das desordens inflamatórias, o aumento da massa adiposa é acompanhado pela resistência à ação da insulina. Neste contexto, mudança na adiposidade induzida pela RC pode modular a ação desse hormônio. Em ratos com baixa capacidade aeróbia, 30 % de RC durante 3 meses foram capazes de reverter a resistência à insulina hepática, além de reduzirem a adipogênese no fígado (BOWMAN *et al.*, 2010). Em outro estudo, com ratos idosos, 20 % de RC durante 8 meses reduziram a adiposidade visceral e a massa adiposa total. Além disso, houve melhora da sensibilidade à insulina, associada com aumento da concentração plasmática de adiponectina e redução nas concentrações séricas de leptina (ESCRIVÁ *et al.*, 2007). O quadro 2 resume alguns trabalhos com RC e seus respectivos efeitos na modulação da massa corporal e da inflamação, bem como na sensibilidade à insulina tanto em humanos como em roedores.

Quadro 2 – Efeito da RC em ratos e humanos sobre adiposidade, adipocinas e resistência à insulina.

Autor	Amostra	Protocolo	Duração da RC	Principais resultados do grupo RC
You et al., 2007	Ratos idosos	40 % RC	2 meses	Reduziu: massa corporal total, massa adiposa e razão gordura/massa corporal magra, níveis de IL-6 e PCR. Melhorou o desempenho físico em teste de natação.
Ding et al., 2011	Ratos magros	45 % RC	4 meses	Reduziu: massa corporal total, tecido adiposo epididimal, diâmetro do adipócito, concentração da insulina plasmática. Aumentou: concentrações de adiponectina e expressão RNAm no tecido

					adiposo epididimal, concentrações de AGL e glicerol plasmático e lipólise no TAB.
Yamashita et al., 2010	et Ratos obesos	20 % RC	10 semanas		Reduziu: massa corporal total, tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal, índice de adiposidade, concentrações de TNF- α , IL-6, IL-10. Aumentou: concentrações de adiponectina.
Davidson et al., 2002	et Ratos magros	40 % RC	20 dias		Reduziu: massa corporal total, tecido adiposo retroperitoneal e epididimal. Aumentou: ação da insulina no músculo esquelético.
Chen et al., 2010	et Ratos magros	40 % RC	12 semanas		Reduziu: massa corporal total, gordura visceral. Aumentou: sensibilidade à insulina.
Larson-Meyer et al., 2006	Humanos magros e com sobrepeso	25 % RC	6 meses		Reduziu: massa corporal magra, tecido adiposo visceral, tecido adiposo subcutâneo e tamanho dos adipócitos.
Weiss Et al., 2006	Humanos magros e com sobrepeso	20 % RC	12 meses		Reduziu: razão TNF- α /adiponectina, concentrações de insulina e glicose plasmática; aumentou índice de sensibilidade à insulina e adiponectina.
Ahmadi et al., 2011	Humanos obesos	30 % RC	7 meses		Reduziu: massa corporal total, massa adiposa, concentração de insulina, glicose, PCR, PAI-I. Aumentou: Adiponectina,

				sensibilidade à insulina.
Redman et al., 2011	Humanos com sobrepeso	25 % RC	24 semanas	Reduziu: massa corporal total, massa adiposa, tecido adiposo abdominal. Melhorou a sensibilidade à insulina.
Xydakis et al., 2004	Humanos obesos	800 kcal/dia	6 semanas	Reduziu: massa corporal total, concentrações de glicose, LDL- C, insulina, leptina, sensibilidade à insulina (HOMA-IR), PCR.

Os mecanismos moleculares pelos quais a RC melhora a ação da insulina ainda não são claros. Entretanto, evidências científicas sugerem que a modulação na expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização desse hormônio esteja envolvida. Desse modo, a RC poderia aumentar a fosforilação da Akt após a estimulação com insulina (MCCURDY *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2011) ou, também, através da redução da fosforilação em serina das proteínas IRS (ZHENG *et al.*, 2009); dessa forma, melhorando o transporte de glicose para o músculo esquelético (DEAN *et al.*, 1996) ou até mesmo para as células do tecido adiposo (ESCRIVÁ *et al.*, 2007).

Apesar das fortes evidências sobre a RC como excelente estratégia de intervenção em pesquisas desenvolvidas com animais e humanos, obesos e/ou idosos, na extensão da longevidade, bem como na redução do TAB, no controle da inflamação sistêmica e de baixa intensidade e na sensibilidade à insulina, nenhum estudo até o presente momento investigou se a RC pode atenuar os efeitos deletérios causados pelo DF.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos apontam que o DF está associado a diversas modificações metabólicas, como ganho repentino de peso corporal, aumento da adiposidade e alteração na produção de proteínas inflamatórias, além do comprometimento na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e, conseqüentemente, na resistência à ação deste hormônio. Apesar de esses achados estarem bem descritos na literatura, poucas pesquisas foram destinadas a desvendar medidas preventivas que possam atenuar esse quadro.

Por outro lado, a literatura científica demonstra que a estratégia nutricional conhecida como RC, quando adotada, proporciona vários benefícios à saúde e, dentro disso, pode reverter os efeitos deletérios associados à resistência à insulina em outras situações experimentais (obesos e idosos).

Outrossim, estudo recente em nosso laboratório demonstrou que o DF foi capaz de aumentar a adiposidade dos animais, sendo considerada uma condição pró-inflamatória, provavelmente devido ao consumo calórico aumentado neste período, comparado com o grupo que continuou o TF. Por isso, é evidente a importância do controle do consumo calórico desde o início do DT.

Entretanto, nenhuma pesquisa até agora foi desenvolvida na perspectiva de investigar o efeito da RC sobre o DF. Portanto, não existe evidência de que os efeitos nocivos resultantes do DF possam ser atenuados por essa intervenção nutricional. Dessa forma, o presente trabalho, fruto das pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório, com objetivo de investigar tratamentos de prevenção para os efeitos associados à interrupção do TF, foi o primeiro em investigar os possíveis benefícios da RC durante o período de DF.

Neste contexto, nós acreditamos que, através da redução da ingestão calórica adotada no período de DF, pode ser possível reduzir os depósitos de gordura corporal e, assim, reduzir as concentrações séricas de proteínas inflamatórias secretadas pelo TAB e, por sua vez, preservar a homeostase glicêmica através do funcionamento adequado das proteínas envolvidas na sinalização da insulina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho investigou os efeitos da RC sobre marcadores de inflamação, homeostase glicêmica e expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no tecido adiposo epididimal de ratos destreinados.

3.2. Objetivos específicos

O presente estudo abrangeu, após 6 semanas de DF, os seguintes aspectos:

- ✓ Avaliação da composição corporal dos animais.
- ✓ Avaliação da homeostase glicêmica.
- ✓ Análise da concentração sérica de adipocinas (TNF- α , leptina e adiponectina).
- ✓ Análise da expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina no TAB epididimal (Akt).
- ✓ Análise da expressão de proteínas inflamatórias no TAB epididimal (JNK, IKK, PKC).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 32 ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, machos, adultos e saudáveis, com 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/FCF-USP). Inicialmente, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente climatizado, a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de 55 ± 10 %, com 15 a 20 trocas de ar por hora, ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro, com luz acesa às 18 horas. Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Vale lembrar que o projeto para a elaboração deste trabalho foi aprovado pela Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA/FCF/311).

4.2. Desenho experimental

Previamente ao início do protocolo, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, dois animais por gaiola, e, então, durante uma semana, foram adaptados à ração controle, às condições da sala e à manipulação. Na semana seguinte, os animais foram distribuídos, de acordo com a média do peso corporal, em dois grupos: treinamento (TREIN, n = 24) e sedentário (SED, n = 8). A partir daí, os animais de ambos os grupos receberam ração controle e foram acompanhados ao longo de 14 semanas, nas quais o grupo TREIN foi submetido ao protocolo de TF durante as 8 primeiras semanas de experimento, enquanto o grupo SED manteve seus hábitos de vida normalmente, sem realizar qualquer programa de exercício físico.

No final da oitava semana, os animais do grupo TREIN foram redistribuídos em 3 novos grupos, com o peso médio estatisticamente semelhante: Grupo Treinamento (TREIN, n = 8), que continuou seguindo o protocolo de TF em esteira ergométrica por mais 6 semanas, mantido o acesso de ração e água *ad libitum*; Grupo Destreinamento (DT, n = 8), constituído por animais que cessaram o protocolo de treino e tiveram acesso à ração e água *ad libitum*. Grupo Destreinamento + Restrição Calórica (DTRC, n = 8), constituído por animais que interromperam o protocolo de treino e receberam 70 % da quantidade de ração consumida pelo grupo DT. É importante ressaltar que, a partir dessa etapa do experimento, todos os animais foram alocados em gaiolas individuais, para que o consumo alimentar

fosse adequadamente controlado. Todos os animais foram eutanasiados no final da décima quarta semana.

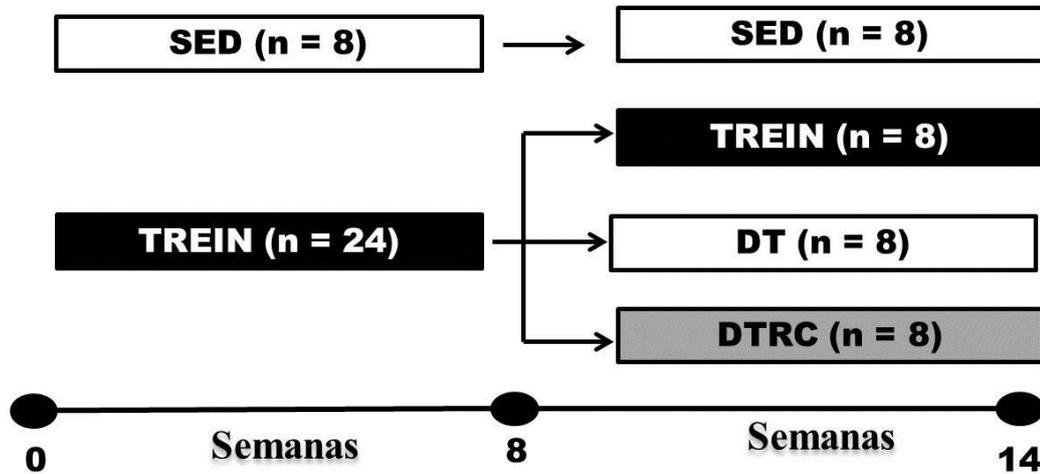


Figura 1 – Desenho experimental

4.3. Ração

As rações utilizadas no presente estudo foram preparadas nas dependências do IQ/FCF-USP, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para a manutenção de roedores (AIN-93M) (REEVES *et al.*, 1993).

4.3.1. Ração Restrição Calórica

Para propiciar que a ingestão de nutrientes dos animais submetidos à RC fosse compatível àqueles que foram alimentados *ad libitum*, o grupo DTRC teve sua ração modificada. Inicialmente, foi calculado o valor calórico, bem como a quantidade de nutrientes constituídos em 100 g de ração AIN-93M. Em seguida, foram retirados 27 g de amido, a fim de proporcionar a restrição energética. Na sequência, a concentração dos demais nutrientes foi aumentada proporcionalmente, garantindo, dessa forma, que este grupo consumisse a quantidade recomendada pelo American Institute of Nutrition e, assim, evitando a instalação de algum tipo de deficiência nutricional não intencional (NRC,1995; PUGH *et al.*, 1999) (Quadro 3).

Quadro3. Composições das rações AIN-93M controle e adaptada para o presente estudo.

Ingredientes	Ração	Ração	Ração	Ração
	Controle	Restrição Calórica	Controle	Restrição Calórica
	g/kg	g/kg	100g	70g
Amido	620,69	501,14	62,07	35,08
Caseína	140	200	14	14
Sacarose	100	100	10	7
Óleo de soja	40	57,14	4	4
Celulose	50	71,43	5	5
Mistura minerais	35	50	3,5	3,5
Mistura vitamínica	10	14,29	1	1
L – Cistina	1,8	2,43	0,18	0,17
Bitartarato de colina	2,5	3,57	0,25	0,25
Tetrabutyl-hidroquinona	0,008	0,008	0,0008	0,0006
TOTAL	1.000	1.000	100	70
<i>Distribuição dos Macronutrientes</i>	Kcal/100g		Kcal/70g	
Carboidrato	288,276		168,3	
Proteína	56,7		56,7	
Lipídio	36		36	
TOTAL	381		261,0	

4.4. Determinação da massa corporal e do consumo da ração

O acompanhamento da massa corporal e do consumo da ração foi realizado três vezes por semana, em balança semianalítica com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Para a avaliação do consumo, foi calculada a diferença entre a quantidade de ração colocada anteriormente e a sobra, considerando-se o montante desperdiçado. Toda a ração desperdiçada foi minuciosamente separada e pesada.

Para calcular a quantidade de ração oferecida para os animais do grupo DTRC, inicialmente, foi verificada a média do consumo de ração semanal do grupo DT (g de ração consumido/100g de massa corporal); em seguida, foi calculado o valor correspondente a 70 % do consumo deste grupo. É importante destacar que a quantidade de ração oferecida foi individualizada para cada animal proporcionalmente à sua massa corporal (g de ração oferecida/100g de massa corporal). A distribuição de ração para o grupo DTRC foi realizada diariamente, a fim de evitar que os animais ficassem em jejum por muito tempo. Por fim, todas as manipulações dos animais ocorreram no ciclo escuro, em horário fixo, com início entre 14h00min e 15h00min.

4.5. Protocolo de treinamento físico

O protocolo de TF utilizado foi de corrida em esteira ergométrica programável (Softmove, Implemed, São Paulo, SP), adaptada para treinar 8 ratos simultaneamente, no ciclo escuro (permitindo que os animais realizassem o exercício físico no horário mais adequado ao padrão da espécie).

O treinamento aeróbio prescrito foi baseado a partir do teste de esforço máximo (TEM), a fim de garantir que o TF fosse realizado em intensidade baixa a moderada (50 a 70 % da velocidade alcançada pelo TEM). O treino foi realizado 5 vezes por semana, com duração de 1 hora, durante 8 semanas, para os animais que foram submetidos ao DF, e 14 semanas, para o grupo TREIN (RODRIGUES *et al.*, 2007; LEHNEN *et al.*, 2010).

4.6. Teste de esforço máximo

O TEM foi realizado conforme descrito na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2007; LEHNEN *et al.*, 2010). Primeiramente, os animais foram submetidos a período de adaptação na esteira, na velocidade de 0,3 km/h, durante 15 min por 3 dias consecutivos. Após esse período, o teste foi iniciado na velocidade de 0,3 km/h, com incremento de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão dos animais. Vale ressaltar que o TEM foi realizado nas semanas 0,

4, 8 e 14, com intuito de ajustar a carga do TF no decorrer do experimento, bem como analisar o declínio da capacidade cardiorrespiratória durante o período de DF.

4.7. Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Com a finalidade de diminuir o intervalo de jejum entre os animais, no dia anterior à eutanásia, foi retirado o acesso à ração por 4 horas; após esse período, os animais voltaram a ter acesso à alimentação por igual tempo de jejum, na quantidade equivalente ao consumo médio/hora do dia anterior. Após essas 4 horas, a ração foi, enfim, totalmente retirada 8 horas antes do início da eutanásia e os ratos foram acondicionados em caixas limpas para garantir que não houvesse quaisquer resquícios de ração.

A ordem dos animais eutanasiados foi rotativa em relação aos grupos, para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e do horário da eutanásia, ou seja, um animal de cada grupo foi eutanasiado até que se repetisse o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum. A eutanásia ocorreu 72 horas após a última sessão de TF, para minimizar qualquer efeito agudo do mesmo.

Os ratos foram eutanasiados por venossecção, sob anestesia com 0,2 ml/kg de peso corporal com uma solução contendo cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Sespo Indústria e Comércio Ltda., Paulínia, SP, Brasil) na proporção 2:1.

O sangue foi coletado, centrifugado a 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos; separadas as respectivas porções séricas, o soro foi devidamente armazenado, em microtubos, em freezer (-80 °C).

Tecidos adiposos brancos retroperitoneal (RET), epididimal (EPI) foram retirados e pesados em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (Ohaus), colocados e embrulhados individualmente em lâminas de papel alumínio, previamente identificadas, rapidamente colocados em nitrogênio líquido e, posteriormente e armazenados em *freezer* (-80°C).

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrintestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (Ohaus), e, posteriormente, levada à estufa a 70 °C para retirada da umidade.

4.8. Parâmetros analisados

4.8.1. Parâmetros avaliados ao longo do período de TF e DF

- ✓ Evolução da massa corporal
- ✓ Consumo de ração

4.8.2. **Composição química da carcaça**

- ✓ Peso da carcaça
- ✓ Umidade
- ✓ Lipídios
- ✓ Massa livre de gordura

4.8.3. **Parâmetros teciduais**

- ✓ Peso e depósitos de tecidos adiposos: retroperitoneal e epididimal

4.8.4. **Parâmetros séricos**

- ✓ Ácidos graxos não esterificados (AGNE)
- ✓ Glicose
- ✓ Adiponectina (Acrp30)
- ✓ Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)
- ✓ OGTT
- ✓ Leptina

4.8.5. **Proteínas totais e fosforiladas**

Tecido adiposo EPI

- ✓ phospho-PKC (Thr⁵³⁸)
- ✓ phospho-Akt (Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸)
- ✓ phospho-IKK-beta (Ser^{178/180})
- ✓ phospho-JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)

4.9. **Determinação da composição corporal**

A avaliação da composição corporal dos animais foi realizada por meio de análise química da carcaça, para a determinação do conteúdo de lipídios, massa livre de gordura e umidade, conforme descrito por Donato *et al.* (2006).

4.10. Determinações bioquímicas

4.10.1. Parâmetros séricos

A concentração de glicose sérica foi determinada pelo método de Bergmeyer (1973). A análise de ácidos graxos não esterificado foi quantificada por método colorimétrico enzimático, utilizando *kit* comercial da WAKO (Pure Chemical Industries, Japan).

As dosagens de citocinas foram realizadas pelo método imunoensaio multiplex, utilizando *kit rat serum adipokine panel 7 LINCOplex*, para dosagem simultânea de TNF- α e leptina, e *kit Rat Adiponectin Single-plex*, para a determinação da dosagem da concentração sérica de adiponectina; ambos os *kits* são produzidos pela LINCO Research (EUA). As determinações foram feitas em equipamento automático Lincoplex 200.

4.10.2. Teste oral de tolerância à glicose

No início do experimento, na 7^a e na 13^a semanas, o teste oral de tolerância à glicose foi realizado em todos os grupos. Após 8 horas de jejum, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), que, na sequência, receberam, via gavagem, solução de glicose na concentração de dois gramas por quilograma de peso. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®).

4.11. Parâmetros teciduais

- ✓ Peso dos depósitos de tecidos adiposos: retroperitoneal e epididimal

4.12. Parâmetros biomoleculares

4.12.1. Western Blotting

Foi realizada a expressão das proteínas fosfo-PKC (Thr⁵³⁸), fosfo-PKB (Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸), fosfo-IKK-beta (Ser^{178/180}), fosfo-JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) no tecido adiposo EPI.

4.12.1.1. Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook *et al.* (1989), descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis 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 amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo), foi preparado com 7,5 a 10% de poliacrilamida, 380 mM Tris. HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

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

As amostras foram fervidas a 100 °C, por 5 minutos, em tampão de amostra contendo 125 mM Tris, pH 6,8, 25% glicerol, 2,5% SDS, 2,5% beta-mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol. O sobrenadante foi então combinado com o tampão acima descrito. Amostras, contendo 50 µg por “poço”, foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida por 60 minutos a 150 V.

4.12.1.3. 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, 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 % KH₂(PO)₄, 1,15 % Na₂H(PO)₄, 0,5 % Tween].

4.12.1.4. Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado (Molico), a 5 %, em tampão PBST, por 1 h, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse, adquirido da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), foi diluído [1: 1000 para fosfo-Akt (Thr³⁰⁸, Ser⁴⁷³) [(1:500 fosfo-JNK (Thr /Tyr), fosfo-

PKC θ (Thr⁵³⁸), fosfo-IKK α/β (Ser^{176/180})] em TBS, com 0,05% Tween 20 (TBST), e utilizado para a incubação com as membranas, *overnight*, com agitação, à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram então marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em TBST, por 2 h, com agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação.

4.12.1.5. Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do *kit* ECL (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio) e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os *blots* foram então visualizados pelo sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE) e analisados pelo *software* ImageQuant TL (GE Healthcare).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk. Nas variáveis nas quais a normalidade não foi confirmada, procedimentos não paramétricos foram utilizados ou os dados foram transformados logaritmicamente.

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de scheffe, para identificação dos contrastes significantes. As correlações parciais entre os dados foram obtidas por meio de correlação linear (Pearson). Em todas as análises, foi considerado o valor de alfa de 0,05. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS versão 18.0.

6. RESULTADOS

A fim de estudar os efeitos deletérios causados pela interrupção do TF, os animais foram inicialmente submetidos ao protocolo de TF aeróbio em esteira ergométrica durante 8 semanas e, a partir daí, redistribuídos em 3 novos grupos. Um grupo foi constituído por animais que continuaram o programa de TF por 6 semanas, mantidos com acesso à ração *ad libitum* (TREIN). Os outros dois grupos tiveram o TF interrompido e foram mantidos com acesso à ração *ad libitum* (DT) ou com RC de 30% (DTRC) por 6 semanas. É importante lembrar que tivemos um grupo que não foi submetido ao TF (SED). Neste contexto, os resultados apresentados a seguir são referentes às alterações metabólicas ocorridas durante ou após as 6 últimas semanas de experimento, ou seja, no período de destreinamento físico.

6.1. Redistribuição dos grupos após 8 semanas de treinamento físico

A tabela 1 apresenta os valores de massa corporal e ASC, referentes ao teste de OGTT, TEM e ITT após 8 semanas de experimento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais para massa corporal, ASC. Entretanto, para o TEM, os animais dos grupos TREIN, DT, DTRC, apresentaram melhor desempenho físico, quando comparados com o grupo SED ($p < 0,05$). Dessa forma, pode-se certificar que, exceto o grupo SED, os animais estavam previamente treinados para a redistribuição dos novos grupos. Além disso, as semelhanças nos valores encontrados na massa corporal e nos testes realizados para sensibilidade à insulina garantem que todos os grupos estavam nas mesmas condições experimentais antes de iniciar o período de DF.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 8 semanas de experimento.

Grupo	Massa corporal (g)	ASC (mg/dL/120min)	TEM (km/h)
SED	505,5 ± 19,42	3.618,75 ± 11,23	1,16 ± 0,19
TREIN	511,4 ± 29,22	3.623,57 ± 1.123,09	2,31 ± 0,41*
DT	503,16 ± 32,16	3.592,5 ± 1.575,43	2,06 ± 0,19*
DTRC	506,31 ± 39,21	3.686,25 ± 1.301,45	2,06 ± 0,37*

Valores expressos em média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ vs SED.

6.2. Desempenho no teste de esforço máximo (TEM) durante o experimento

Durante o experimento, foi realizado o TEM, com o intuito de ajustar a carga do TF, bem como analisar o declínio da capacidade cardiorrespiratória no período de DF. Os resultados do TEM são encontrados na figura 2. Observamos que o grupo TREIN foi maior em relação aos grupos DT e DTRC no teste realizado na oitava semana; entretanto, sem diferença estatística. Além disso, observou-se que o grupo TREIN alcançou velocidade estatisticamente maior quando comparado com os demais grupos nos testes realizados na décima primeira (SED = $1,01 \pm 0,15$ km/h; TREIN = $2,4 \pm 0,38$ km/h; DT = $1,45 \pm 0,11$ km/h; DTRC = $1,6 \pm 0,47$ km/h) e na décima quarta semanas (SED = $1,01 \pm 0,15$ km/h; TREIN = $2,4 \pm 0,40$ km/h; DT = $1,37 \pm 0,16$ km/h; DTRC = $1,35 \pm 0,16$ km/h). Todavia, 6 semanas de DF foram suficientes para provocar redução no desempenho do TEM de 33,49%, para os animais dos grupos DT, e 34,46% no grupo DTRC.

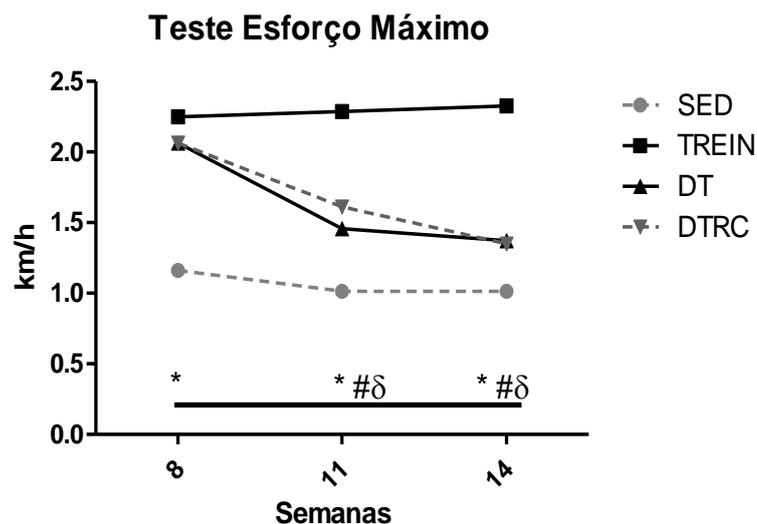


Figura 2 - Evolução do desempenho no TEM durante o estudo. Valores expressos em média. Diferença entre os grupos: * $P < 0,05$ SED vs demais grupos; # $P < 0,05$ DT vs TREIN; δP DTRC vs TREIN.

Por outro lado, não houve diferença na velocidade do TEM entre os grupos DT, DTRC e SED. Frente a esses resultados, pode-se observar, nos animais dos grupos DT e DTRC, que seis semanas DF foram suficientes para reverter as adaptações cardiorrespiratórias adquiridas ao longo de 8 semanas de TF.

6.3. Massa corporal e ganho de peso

Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos valores de massa corporal referentes à décima quarta semana de experimento. Nesse sentido, o grupo DT ($601,6 \pm 51,18$ gramas) apresentou maior valor em relação ao grupo TREIN ($536,22 \pm 37,80$ gramas). Entretanto, ratos submetidos ao DF e a 30% de RC mostraram massa corporal (DTRC = $477,92 \pm 53,01$ gramas) significativamente menor do que a do grupo DT. A massa corporal do grupo DTRC também foi mais leve do que a dos animais do grupo SED ($555,2 \pm 25,88$). É importante lembrar que DTRC mostrou massa corporal semelhante aos animais que continuaram o protocolo de TF (figura 3).

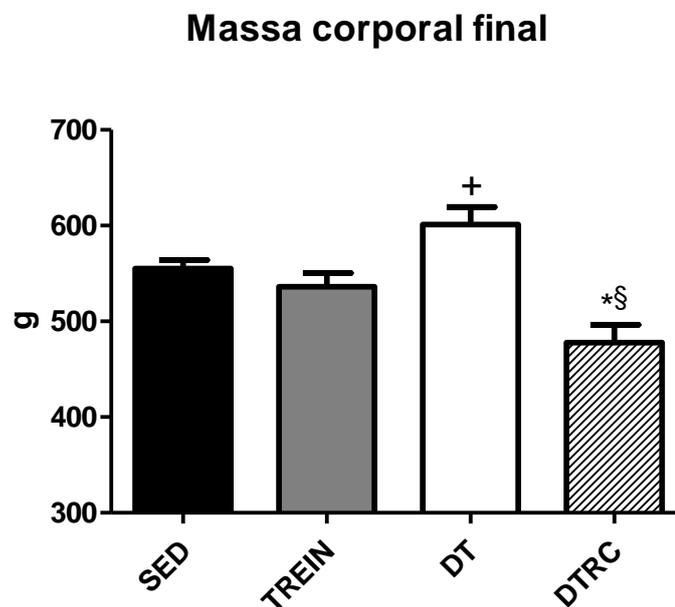


Figura 3 – Massa corporal final dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento. *P < 00,5 vs SED; †P > 0,05 vs TREIN; §P < 0,05 vs DT.

A fim de analisar o ganho de peso adquirido durante o período de DF, foi calculada a variação relativa percentual da massa corporal ($\Delta\%$) referente a 8^a e a 14^a semanas (figura 4).

Varição relativa da massa corporal (8^o e 14^o semana)

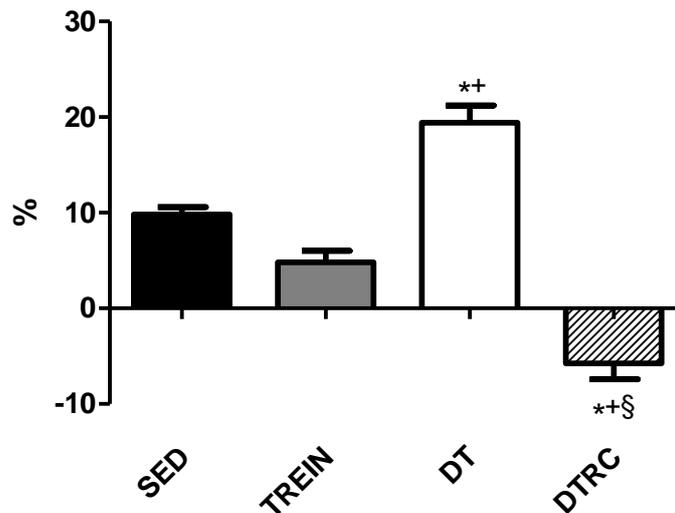


Figura 4 – Variação relativa da massa corporal (8^a e 14^a semanas).

Valores expressos em média e desvio padrão. *P < 0,05 vs SED; †P > 0,05 vs TREIN;

§P < 0,05 vs DT.

Observamos que DT apresentou maior ganho de peso em relação aos grupos SED e TREIN (DT = 19,43 ± 5,06%; SED = 9,81 ± 2,14 %; TREIN = 4,82 ± 3,13%). Entretanto, a RC foi eficaz na atenuação do ganho ponderal causado pelo DF (DTRC -5,75 ± 4,78%; p < 0,05 vs DT). Além disso, constatamos que os ratos do grupo DTRC foram os únicos animais que perderam peso durante as seis últimas semanas de experimento.

A figura 5 demonstra o ganho percentual de peso semanal. Neste sentido, verificou-se que, já na primeira semana de destreinamento (9^a semana), o grupo DT ganhou praticamente o dobro de peso em relação aos animais que não realizaram nenhum tipo de exercício físico (SED: 1,95 ± 0,93 %; DT: 3,58 ± 0,9%; p < 0,05); essa relação foi mantida semanalmente até o final do experimento. Adicionalmente, as quatro semanas iniciais foram cruciais para o aumento da massa corporal deste grupo (12^a semana: DT = 16,27%). No entanto, novamente, a intervenção nutricional foi extremamente importante para prevenir o ganho ponderal ocasionado através da interrupção do TF e, essa prevenção, foi assistida desde o início do DF.

Ganho percentual do peso semanal

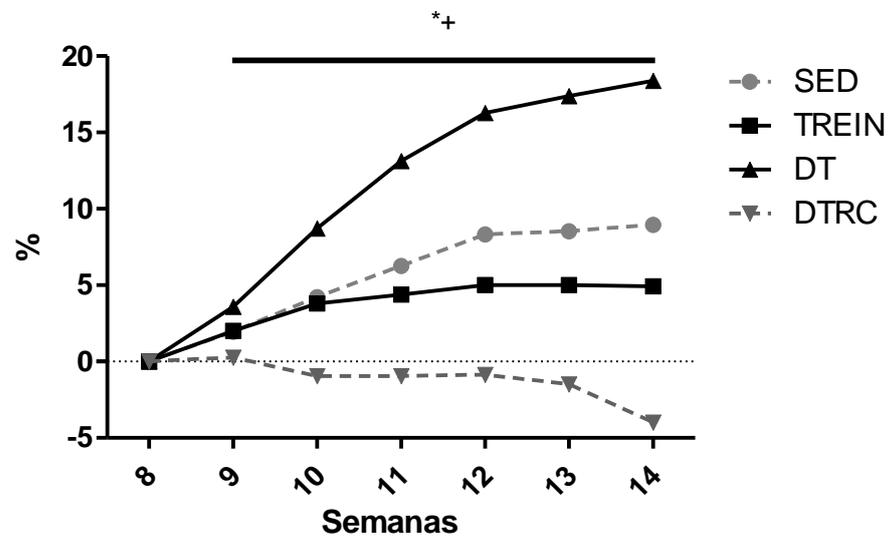


Figura 5 – Ganho percentual do peso semanal. Valores expressos em média. Diferença entre os grupos: * $P < 0,05$ DT vs demais grupos; ⁺ $P < 0,05$ DTRC vs demais grupos

6.4. Composição corporal

Os valores de composição corporal são apresentados na figura 6, de forma absoluta e em relação ao peso da carcaça no final do experimento. Podemos verificar que ratos destreinados submetidos à RC apresentaram menor peso de carcaça em comparação os grupos DT e SED ($p < 0,05$); entretanto, sem diferença estatística com os animais treinados (SED = $493, \pm 21,57$ g; TREIN = $485,05 \pm 26,26$ g; DT $533,29 \pm 47,09$ g; DTRC = $436,06 \pm 52,51$ g).

6.4.1. Gordura e massa dos coxins adiposos

Diferença estatística foi encontrada para gordura nos valores absolutos e relativos. Nesse sentido, DTRC apresentou valores significativamente menores em comparação aos demais grupos (SED = $61,46 \pm 17,45$ g / $12,42 \pm 3,5$ %; TREIN = $36,15 \pm 9,03$ g / $7,47 \pm 1,97$ %; DT = $59,50 \pm 15,86$ g / $11,12 \pm 2,85$ %; DTRC = $16,07 \pm 6,97$ g / $3,67 \pm 1,48$ %). Além disso, o DF, quando acompanhado com fornecimento de ração à vontade, resultou no aumento de gordura em relação aos animais que mantiveram o protocolo de TF ($p < 0,05$); todavia, sem diferença significativa com o grupo SED.

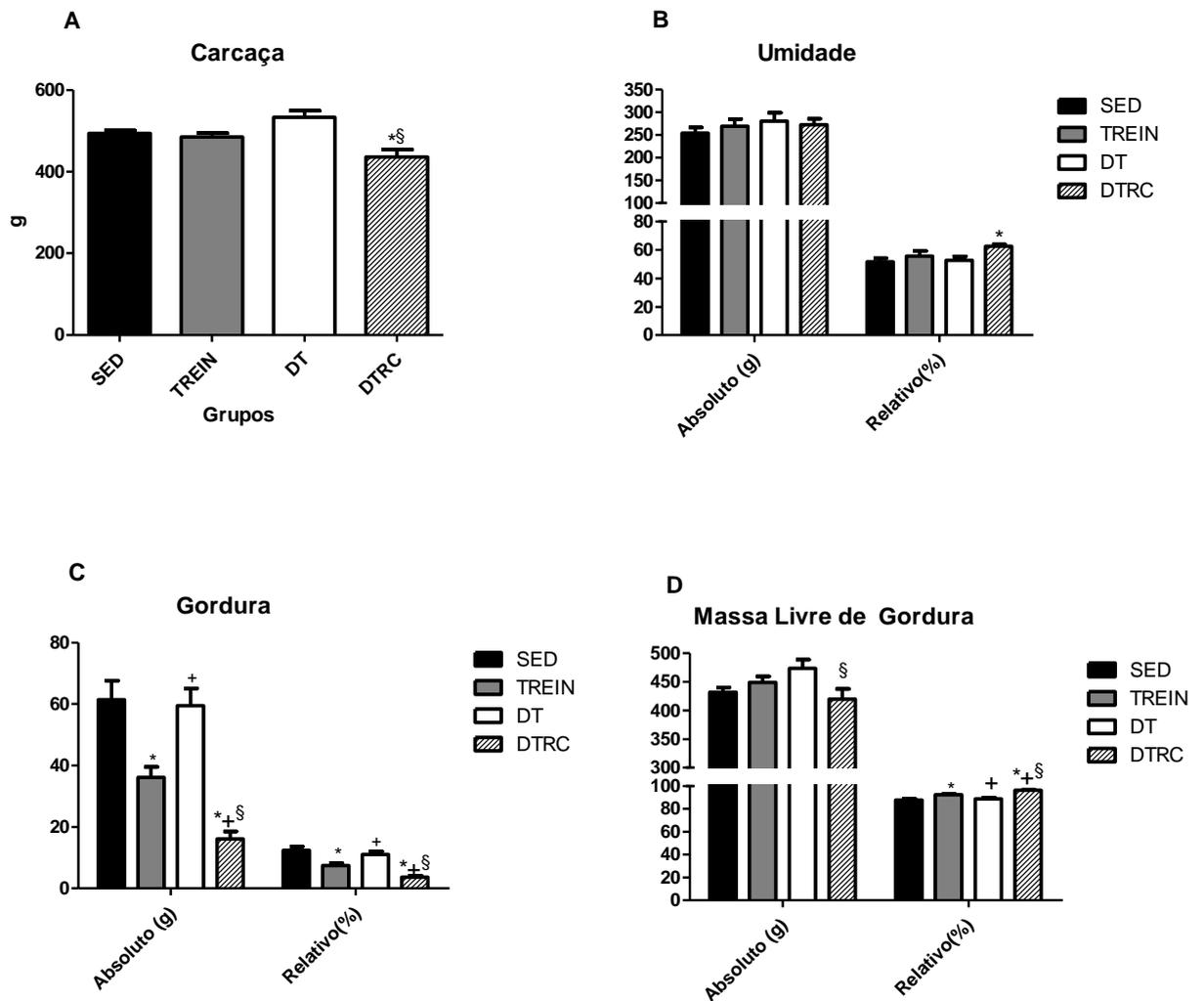


Figura 6 - Massa e composição química da carcaça dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento. ^{*}P < 0,05 vs SED; ⁺P > 0,05 vs TREIN; [§]P < 0,05 vs DT.

Ainda nesse contexto, a RC mostrou-se potente intervenção nutricional na redução de peso dos coxins adiposos EPI e RET, quando comparado com os demais grupos (tabela 2).

Tabela 2 – Coxins adiposos RET e EPI dos grupos SED, TREIN, DT, DTRC após 14 semanas de experimento.

	EPI	RET	EPI+RET
SED	10,61 ± 4,36	7,89 ± 2,60	18,51 ± 6,31
TREIN	7,43 ± 3,36	5,06 ± 1,95	12,49 ± 4,96
DT	9,87 ± 2,49	7,24 ± 2,86	17,12 ± 4,95
DTRC	3,37 ± 1,58 ^{*+§}	1,66 ± 1,52 ^{*+§}	5,04 ± 2,97 ^{*+§}

*P < 0,05 vs SED; ⁺P < 0,05 vs TREIN; [§]P < 0,05 vs DT.

6.4.2. Massa livre de gordura

No valor absoluto, diferença estatística foi observada somente entre os grupos DT e DTRC. Nesse aspecto, a massa livre de gordura (MLG) do grupo DT foi maior que DTRC (SED = 433,06 ± 23,02 g; TREIN = 448,89 ± 27,84 g; DT = 473,78 ± 41,97; DTRC = 419,98 ± 49,86 g). Por outro lado, quando relativizamos a MLG em relação ao peso corporal no final do experimento, observamos que MLG do grupo DTRC foi estatisticamente maior em relação aos demais grupos. E que o grupo DT obteve percentual de MLG menor que TREIN, porém sem diferença entre SED. Por fim, os ratos que continuaram o programa de TF nas últimas 6 semanas apresentaram percentual de MLG estatisticamente maior que os animais sedentários (SED = 87,57 ± 3,5 %; TREIN = 92,52 ± 1,9 %; DT = 88,87 ± 2,55 %; DTRC = 96,33 ± 1,45 %).

6.5. Consumo de ração

As figuras 7 e 8 apresentam o consumo médio de ração semanal, por 100g de massa corporal, e o consumo total de ração, em gramas, nas últimas seis semanas de experimento, respectivamente. Como esperado, os animais do grupo DTRC comeram menos ração, comparados com os outros grupos (p < 0,05). Por outro lado, apesar de o grupo DT apresentar maior ganho ponderal (19,43%), não houve diferença estatisticamente significativa no consumo alimentar entre os animais SED, TREIN e DT, no montante total, bem como na quantidade de ração consumida por semana.

Média de consumo de ração semanal

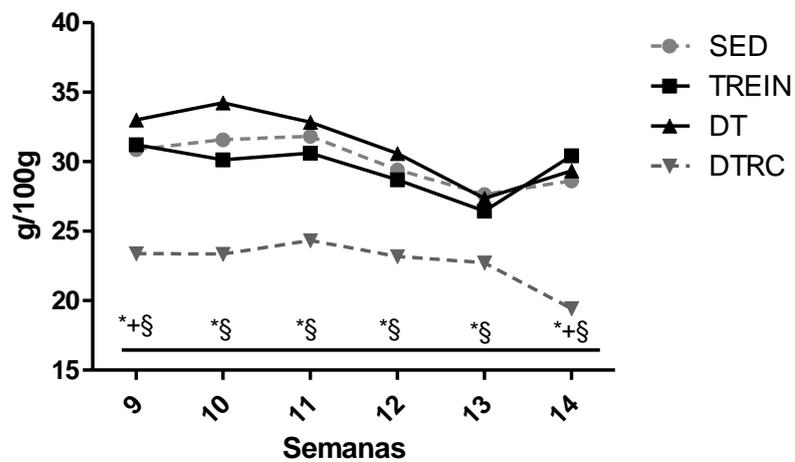


Figura 7 - Consumo médio de ração semanal dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC durante a 9ª e a 14ª semanas de experimento. *P < 00,5 DTRC vs SED; +P > 0,05 DTRC vs TREIN; §P < 0,05 DTRC vs DT.

Consumo total de ração (9º a 14º semana)

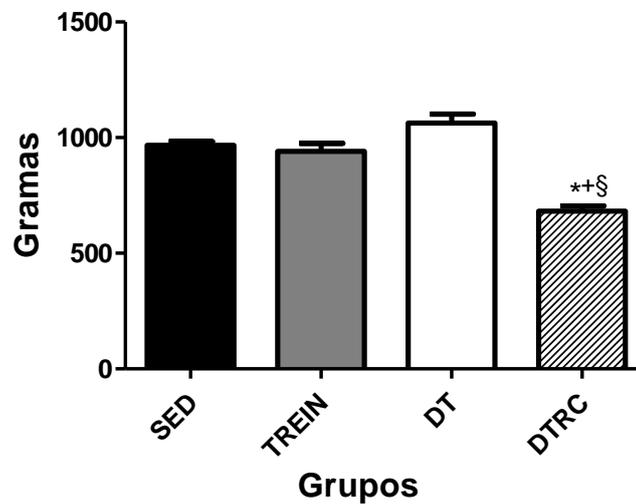


Figura 8 - Consumo total de ração dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC entre a 9ª e a 14ª semanas de experimento. *P < 00,5 DTRC vs SED; +P > 0,05 DTRC vs TREIN; §P < 0,05 DTRC vs DT.

6.6. Coeficiente de eficiência metabólica

O coeficiente de eficiência metabólica (EM) é a divisão entre o consumo médio semanal e a média do ganho de peso dos animais. Esse coeficiente indica quantos gramas de ração ingeridos foram necessários para cada grama de peso aumentado. Dessa forma, quanto menor for o coeficiente de eficiência, menos comida o animal precisou comer para ganhar o peso equivalente, indicando aumento de EM.

Coeficiente de Eficiência Metabólica

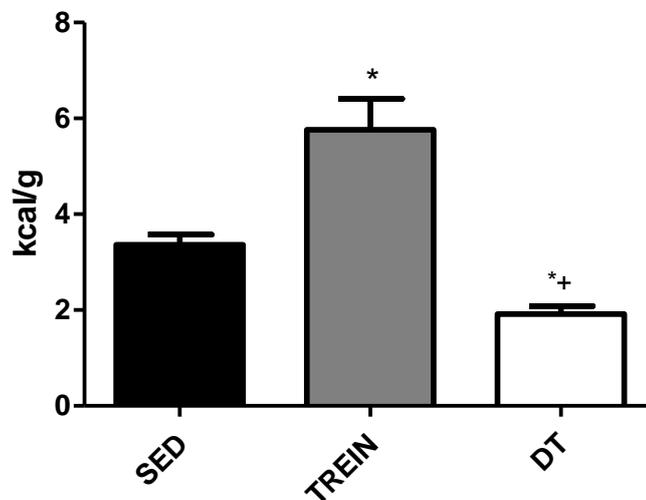


Figura 9 – Média do Coeficiente de Eficiência Metabólica dos grupos SED, TREIN e DT durante a 9ª e a 14ª semanas de experimento. *P < 0,05 vs SED; +P > 0,05 vs TREIN.

Como pode ser observado na figura 9, o grupo DT apresentou o coeficiente de eficiência significativamente menor do que os grupos SED e TREIN, indicando aumento em sua EM (SED = $3,36 \pm 0,60$ kcal/g; TREIN = $5,76 \pm 1,58$ kcal/g; DT = $1,91 \pm 0,16$ kcal/g). A partir do coeficiente de EM, observou-se que animais que cessaram a prática de exercício físico necessitaram de 43% menos ração para ganhar a mesma quantidade de peso corporal, comparados a animais que não foram submetidos a TF algum. Uma vez que os animais apresentaram consumo de ração equivalente, o aumento da EM explica o maior ganho ponderal dos animais do grupo DT em relação aos outros grupos.

Por outro lado, pelo fato de os animais do grupo TREIN continuarem o protocolo de exercício físico em esteira, grande parte dos nutrientes ingeridos eram destinados à produção de energia para contrações musculares na realização do TF; explicando, portanto,

a necessidade de os animais desse grupo precisarem comer 41% e 66% mais ração para ganhar a mesma quantidade de peso corporal, comparados aos grupos SED e DT, respectivamente.

6.7. Glicemia em jejum e teste oral de tolerância à glicose

A tabela 3 representa a glicemia de jejum da oitava e da décima terceira semanas de experimento e o delta percentual referente a essas duas análises. Observamos que não houve diferença estatística entre os grupos para qualquer variável investigada. Além disso, nota-se normalidade nos valores de glicemia para todos os grupos nas duas semanas analisadas.

Tabela 3 – Glicemia de jejum (mg/dl) na semana 7 e na semana 13 e $\Delta\%$ dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC

	Semana 8	Semana 13	$\Delta\%$
SED	98,88 \pm 8,69	94,63 \pm 9,95	- 4,16 \pm 8,22
TREIN	98,57 \pm 8,34	92,71 \pm 12,60	-6,14 \pm 7,58
DT	97,13 \pm 9,52	93,75 \pm 9,87	- 2,82 \pm 9,79
DTRC	98,13 \pm 8,11	103,37 \pm 6,56	5,87 \pm 9,83

A figura 10 demonstra ASC referente ao teste oral de tolerância à glicose, realizado na oitava e na décima terceira semanas, além do delta percentual. Como já foi visto anteriormente, não houve diferença estatística na ASC da oitava semana, garantindo, dessa forma, a homogeneidade no que diz respeito à sensibilidade à insulina dos animais após a redistribuição dos grupos. Contudo, seis semanas de RC foram capazes de melhorar a sensibilidade à insulina de animais que interromperam o TF em relação aos grupos DT e SED, sendo, ainda, similar aos animais que continuaram a prática de TF. Além disso, DT apresentou ASC estatisticamente maior no grupo TREIN. Da mesma forma, essas diferenças estatísticas foram mantidas quando analisado o delta percentual (SED = 83 \pm 61,60 %; TREIN = - 20,61 \pm 12,55 %; DT = 63,71 \pm 25,33 %; DTRC = - 21,60 \pm 3,5 %). Baseados nesses resultados, podemos considerar que o DF foi capaz de diminuir a sensibilidade à insulina; no entanto, a RC, além de atenuar o efeito encontrado no DF, teve a capacidade de melhorar a ação desse hormônio, após seis semanas de intervenção.

É importante ressaltar que, assim como DTRC, animais que continuaram o programa de TF melhoram a sensibilidade à insulina.

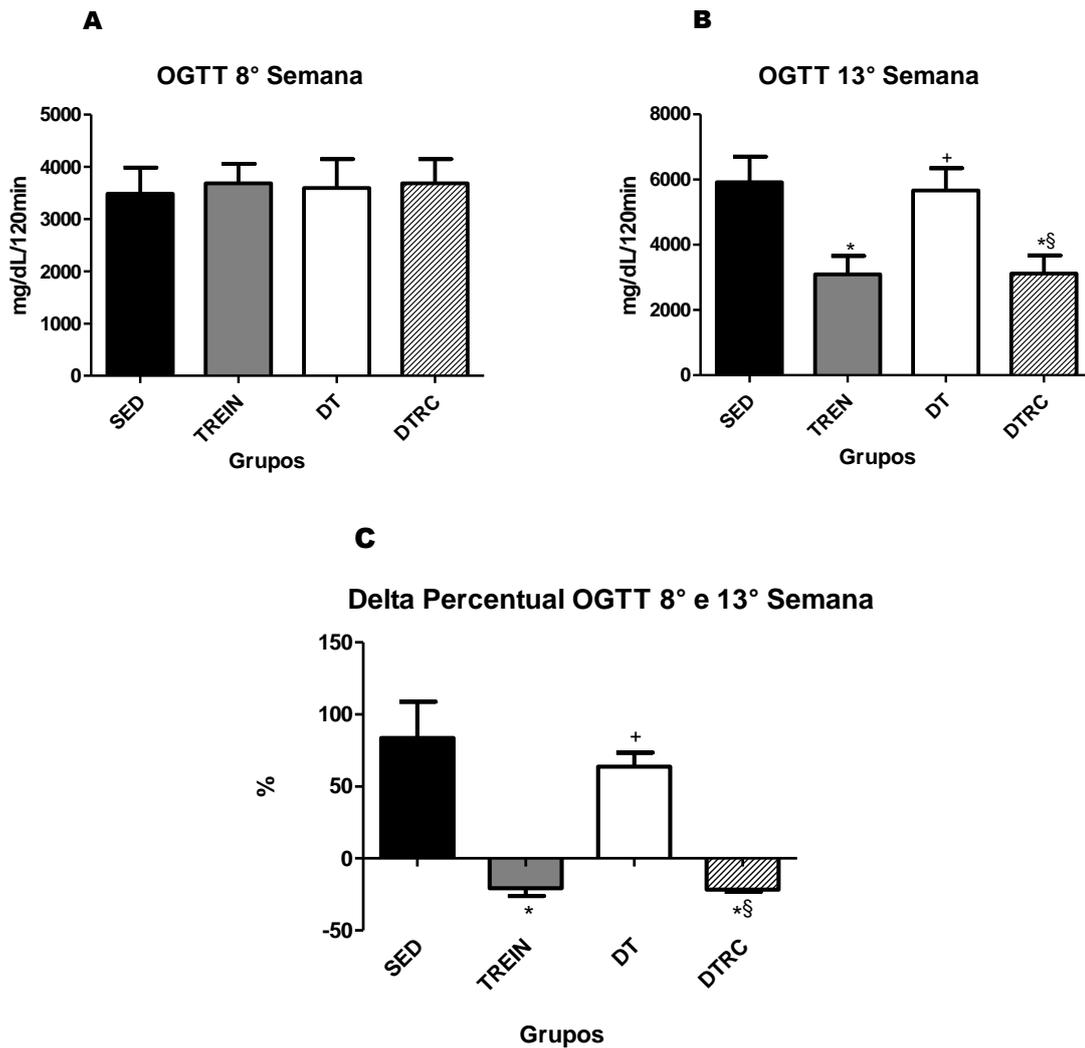


Figura 10 – Área sob a curva e delta percentual do teste oral de tolerância à glicose realizado na 8^a e na 13^a semanas. *P < 0,05 vs SED; ⁺P > 0,05 vs TREIN; §P < 0,05 vs DT.

Quando correlacionamos valores de ASC da décima terceira semana e quantidade de gordura houve correlação estatisticamente significativa e de moderada associação ($r = 0,6$; $p = 0,01$). Ou seja, ratos com maior depósito de gordura apresentaram maior valor para ASC referente ao OGTT da décima terceira semana. Dessa maneira, podemos registrar que a perda na sensibilidade à insulina é diretamente proporcional à adiposidade dos animais (figura 11).

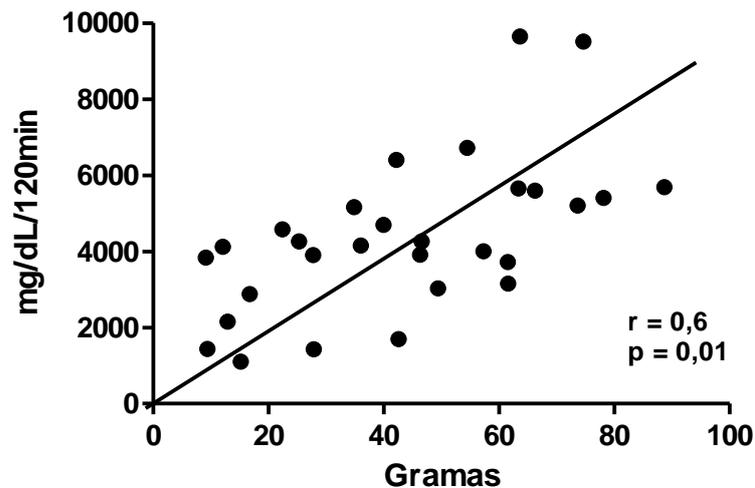


Figura 11 – Correlação entre área sob a curva da 13ª semana e gordura dos animais dos grupos SED, TREIN, DT, DTRC.

6.8. Concentrações séricas de citocinas e ácidos graxos não esterificados

A tabela 4 apresenta os valores séricos de leptina, TNF- α , adiponectina e AGNE. Verificamos que a RC foi capaz de reduzir significativamente as concentrações séricas de leptina e AGL em relação aos demais grupos. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos para TNF- α e adiponectina.

Tabela 4 - Concentrações séricas de leptina, ácidos graxos não esterificados, TNF-alfa e adiponectina dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.

	SED	TREIN	DT	DTRC
Leptina (ng/ml)	3,79 \pm 2,71	2,67 \pm 1,16	4,75 \pm 3,03	1,02 \pm 0,47 ^{++§}
AGNE (mEq/l)	0,055 \pm 0,003	0,056 \pm 0,003	0,058 \pm 0,009	0,047 \pm 0,003 ^{++§}
TNF-alfa (pg/ml)	24,85 \pm 11,45	24,23 \pm 13,32	26,47 \pm 12,67	23,54 \pm 10,49
Adiponectina (ng/ml)	27.665 \pm 4.534,	24.987 \pm 3.076	21.662 \pm 5.465	25.047 \pm 8.109

P < 00,5 vs SED; ⁺P > 0,05 vs TREIN; [§]P < 0,05 vs DT.

6.9. Expressão proteica no tecido adiposo EPI

Na figura 12, estão representados os resultados de expressão proteica e fosforilação no resíduo de treonina 183 e de tirosina 185 da proteína JNK e fosforilação das proteínas quinases IKK e PKC θ referentes aos animais após 14 semanas de experimento, obtidos pela técnica de *Western Blotting*.

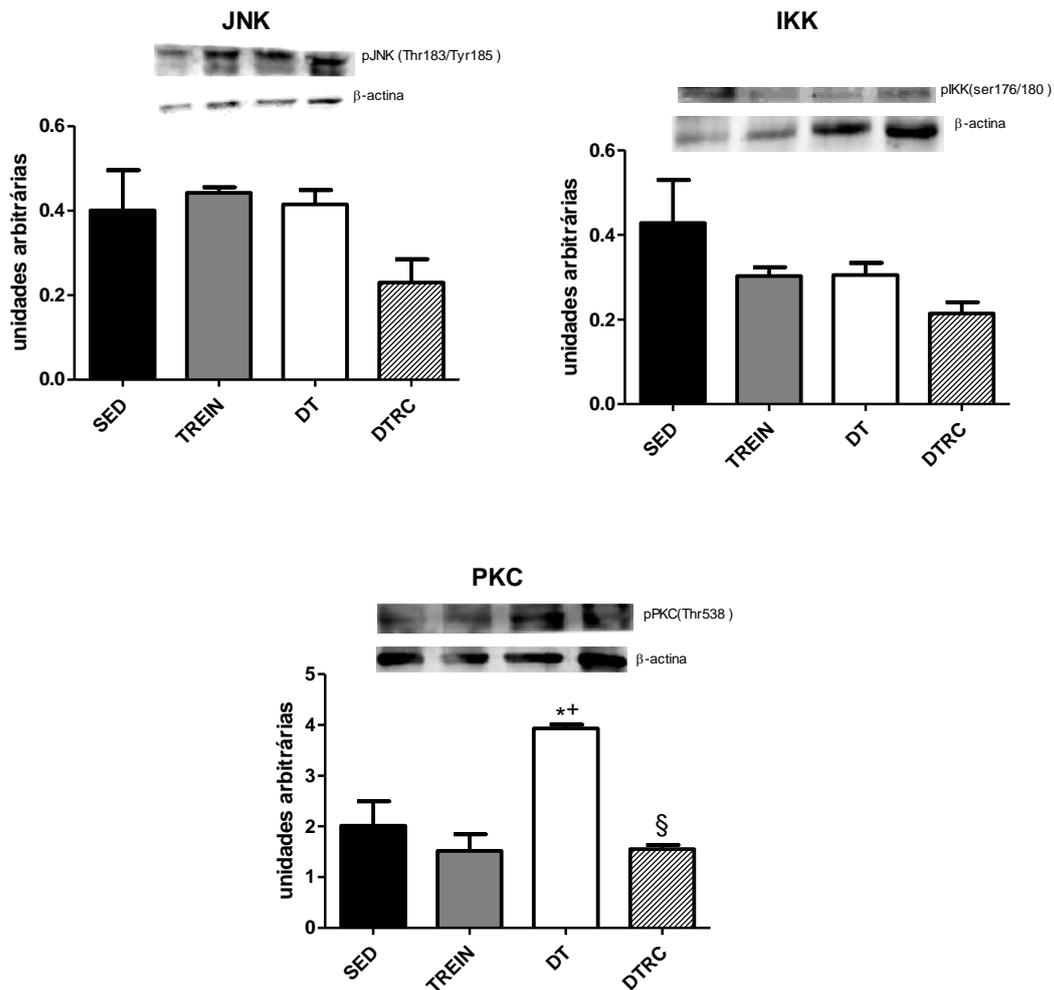


Figura 12 - Expressão e fosforilação das proteínas JNK, IKK e PKC no tecido adiposo EPI dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento. *P < 0,05 vs SED; +P > 0,05 vs TREIN; §P < 0,05 vs DT.

Podemos constatar que o grupo DTRC manteve menor valor na expressão das proteínas JNK e IKK fosforiladas; contudo, sem diferença estatística. No entanto, animais

submetidos à RC foram estatisticamente menores ao grupo DT na expressão da proteína PKC θ fosforilada. Além disso, DT foi estaticamente maior quando comparado aos grupos TREIN e SED.

Quando analisamos a expressão e a fosforilação da proteína AKT no tecido adiposo EPI, proteína envolvida da via sinalização da insulina, não encontramos diferença estatística ($p = 0,08$), embora possamos observar que os animais do grupo DT apresentaram menor média em relação aos animais do grupo TREIN, sendo semelhante ao grupo SED. Além disso, constatamos que o grupo DTRC obteve menor fosforilação da Akt quando comparado com os demais grupos (figura 13).

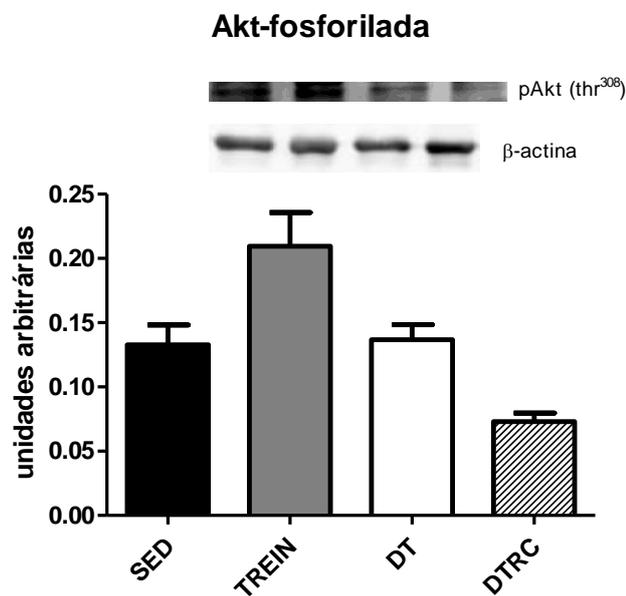


Figura 13 - Expressão e fosforilação da proteína Akt no tecido adiposo EPI dos animais dos grupos SED, TREIN, DT e DTRC após 14 semanas de experimento.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com objetivo de investigar possíveis intervenções que minimizassem os efeitos deletérios causados pelo destreino físico. Para tanto, adotamos o protocolo de RC e avaliamos se essa intervenção nutricional era capaz de atenuar as consequências atribuídas à cessação do treinamento físico.

A RC, definida como uma redução na ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem causar desnutrição, é uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies. Evidências científicas associam a RC à menor incidência de doenças relacionadas à idade, tais como as cardiovasculares, o câncer e o diabetes.

Diversos trabalhos científicos descrevem que o DF está associado com distúrbios metabólicos (PETIBOIS *et al.*, 2004 SIMSOLO *et al.*, 1993 ; APPLGATE *et al.*, 1984) e, mais recentemente, com estado de inflamação crônica e de baixa intensidade (FATOUROS *et al.*, 2005; WOO JINHEE *et al.*, 2012). Nesse contexto, a hipótese teórica seria que a RC atenuaria o ganho de peso e gordura corporal ocasionado pelo DF e, por sua vez, atenuaria o quadro inflamatório, resultando na melhora da sensibilidade à insulina.

Em suma, verificamos que a RC foi capaz de reverter alterações metabólicas consequentes do DT. Os resultados do nosso estudo mostraram que a RC promoveu redução na massa e na gordura corporais, melhora na sensibilidade à insulina, além de reduzir as concentrações séricas de AGL e a fosforilação de proteínas inflamatórias no TAB de ratos destreinados.

O $VO_{2máx}$ é considerado padrão ouro na literatura para avaliar a capacidade funcional de atletas e indivíduos com distúrbios metabólicos, principalmente aquelas ligadas a distúrbios respiratórios e cardiovasculares. Além disso, $VO_{2máx}$ também fornece dados valiosos para prescrição apropriada de exercício físico (WICHI *et al.*, 2007; DE ANGELIS *et al.*, 2000). Entretanto, a mensuração de $VO_{2máx}$ em animais tem sido limitada, em virtude do alto custo do aparelho analisador de gases (SCHEFER; TALAN, 1996).

Portanto, no presente estudo, utilizamos o TEM, no qual o animal corre até a exaustão sobre a esteira. Esse teste tem sido utilizado na literatura científica como método alternativo para avaliar a capacidade física e também tem sido usado na prescrição de exercício físico em animais experimentais (DE ANGELIS *et al.*, 2000; BERTAGNOLLI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007). Além disso, pesquisas demonstram que $VO_{2máx}$ pode ser estimado através do TEM (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Os dados apresentados após oito semanas de TF mostraram que animais dos grupos TREIN, DT e DTRC apresentaram melhor desempenho físico no TEM, quando comparados com o grupo SED, demonstrando, portanto, que o protocolo de TF adotado no

presente trabalho foi efetivo em melhorar a condição física dos animais. Adicionalmente, observamos que a capacidade funcional, avaliada através da velocidade máxima obtida pelo TEM, aumentou em 71,5% nos animais que foram submetidos ao protocolo de TF de 8 semanas (dados não mostrados).

Dados similares aos nossos foram encontrados por Lehnen *et al.* (2010). Após submeterem animais ao TF em esteira (5 vezes por semana, 60min/dia por 10 semanas, 50-70% da velocidade máxima alcançada no TEM), esses dados demonstraram melhora de 85% na capacidade funcional. Ratas ovariectomizadas, submetidas ao protocolo de TF similar ao utilizado em nosso estudo (50 a 70% da velocidade máxima alcançada no TEM, 1 hora por dia, 5 dias por semana durante 8 semanas), demonstraram melhora de 70% na capacidade cardiorrespiratória, ou seja, estaticamente maior do que o grupo SED (SOUZA *et al.*, 2007).

Observamos que animais dos grupos DT e DTRC declinaram em 33,49% e 34,46%, respectivamente, no desempenho no TEM após seis semanas de interrupção do TF. Nesse contexto, Mujika e Padilla (2000) revisaram que o $VO_{2máx}$ se reduz drasticamente após curto prazo de cessação de TF. Outrossim, Bocalini *et al.* (2010), em estudo com mulheres idosas, demonstram que 2 semanas de DF foram suficientes para reverter os efeitos cardiovasculares adquiridos ao longo do TF. Em contraste, Lehnen *et al.* (2010) mostraram que uma e duas semanas de DF não foram suficientes para reverter os benefícios cardiorrespiratórios induzidos por 10 semanas de TF em ratos hipertensos. Estas discrepâncias entre os resultados são, provavelmente, causadas pelo modo, pela frequência, pela intensidade e pela duração do TF adotado nos diversos estudos.

A redução inicial do $VO_{2máx}$ encontrada no DF pode ser explicada através do princípio conhecido como reversibilidade, o qual mostra que, quando o TF é suspenso ou reduzido, os sistemas corporais se reajustam de acordo com a diminuição do estímulo (COYLE, 1994). Nesse sentido, pode-se observar redução do débito cardíaco consequente da redução do volume sistólico. Além disso, o DF também provoca alterações das adaptações do músculo esquelético, que resultam na redução significativa da diferença artério-venosa máxima de oxigênio (capacidade dos músculos esqueléticos levarem e consumirem oxigênio), contribuindo também para a redução do $VO_{2máx}$ (EVANGELISTA & BRUM, 1999).

Baseado nesses conceitos, Coyle *et al.* (1984), em estudos com atletas de *endurance*, demonstraram que o volume sistólico durante o exercício físico máximo diminuiu 11% em relação aos valores atingidos após o treinamento físico. Ademais, Convertino *et al.* (1982) mostraram que, após o DF, o fluxo sanguíneo em repouso para a musculatura das pernas estava reduzido em 36%, estando este associado à redução de 38% da capilarização. Marini *et al.* (2008) relataram que o TF aumenta a vascularização e a

capilaridade cardíaca de ratos *Sprague-Dawley*. Entretanto, esses benefícios foram suspensos após quatro semanas de DF.

Observamos que animais submetidos ao DF e com oferta de ração à vontade chegaram ao final do experimento 10% e 7% mais pesados em relação aos grupos TREIN e SED, respectivamente. Além disso, ao verificarmos o ganho de peso, surpreendentemente, constatamos que o grupo DT obteve ganho ponderal de 19% em relação à massa corporal, sendo estatisticamente maior aos grupos SED (9,81%) e TREIN (3,13%). Do mesmo modo, o DT apresentou maior estoque de gordura em comparação aos demais grupos (figura 6). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada no consumo alimentar entre esses animais (figura 7). Ou seja, o aumento significativo no ganho de peso e no acréscimo de gordura corporal obtido pelos animais do grupo DT, quando comparados aos ratos SED, pode ser atribuído à interrupção do programa de exercício físico por si, sugerindo-se que o período de DF promove aumento na capacidade lipogênica independentemente de mudanças na ingestão de calorias. Em conformidade com nossos resultados, Laye et al. (2007), observaram, em roedores, que independentemente do excesso de caloria consumida, a interrupção da prática de atividade física foi capaz de promover o aumento da gordura abdominal. Além disso, Petibois et al. (2004), apesar de terem encontrado alterações deletérias na composição corporal durante o período de DF, não observaram qualquer diferença nos hábitos alimentares entre os sujeitos.

É possível que mecanismos envolvidos na termogênese e no gasto energético possam estar relacionados com esse processo. Arnold e Richard (1987) mostraram redução nos estoques de tecido adiposo marrom (TAM), importante local de regulação da termogênese, em ratos após 30 dias de TF em esteira. Interessantemente, os estoques de TAM continuaram reduzidos durante o DF, contribuindo, dessa forma, para o menor gasto energético nesse período. Em humanos, Ormsbee e Arciero (2012) demonstraram redução na taxa de metabolismo de repouso (7%) após a interrupção do TF em atletas de natação.

Ainda nesse contexto, é possível que mudanças na atividade da enzima LPL possam contribuir para o ganho de gordura após a interrupção do treinamento físico. Simsolo (1993) demonstrou, em estudo com corredores de elite, que 2 semanas de DF foram capazes de reduzir a atividade da LPL no músculo e, concomitantemente, provocar aumento da atividade dessa enzima no tecido adiposo. Além disso, foi observado que a razão tecido adiposo/músculo, para a atividade da LPL, foi maior após o DF. Assim, os autores sugeriram que a remodelação do comportamento da LPL nesses tecidos, após a cessação do exercício físico, favorece o aumento dos estoques de gordura e, portanto, o aumento da adiposidade. Por sua vez, Lambert (1994), a fim de investigar os efeitos metabólicos envolvidos no ganho de peso em ratos destreinados, encontrou aumento na atividade da LPL no tecido adiposo, uma e duas semanas após a interrupção do TF. Além disso,

similarmente aos nossos resultados, o autor constatou aumento da eficiência metabólica, ganho de peso e gordura corporal sem nenhuma diferença no consumo energético; sugerindo, portanto, que a interrupção do TF resulta no aumento da capacidade de lipogênese, em especial no tecido adiposo, independentemente da oferta energética.

Por fim, evidências experimentais demonstram a participação de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCP) no controle do dispêndio energético. Pesquisas recentes mostraram que camundongos que superexpressam UCP-3 no músculo são resistentes à obesidade e ao diabetes induzidos por dieta (SCHRAUWEN e HESSELINK, 2004). Em contraste, a expressão gênica da UCP-3 está diminuída na obesidade, em camundongos e ratos Wistar obesos (BAO *et al.*, 1998. DIEHL e HOEK, 1999).

Baseando-se nesse contexto, é possível inferir que alterações na expressão dessas proteínas possam estar relacionadas ao ganho de peso e gordura corporal no DF. Boss e colaboradores (2000) evidenciaram que ratos treinados apresentam diminuição de 60% e 76% na expressão gênica de UCP-3 nos músculos sóleo e tibial anterior, respectivamente. Os autores sugerem que tal adaptação ocorre devido a maior demanda energética imposta pela contração muscular e que isso obriga os músculos a se adaptarem para tornar mais eficiente a ressíntese de ATP. O interessante é que tal mudança parece permanecer após o exercício físico.

Um grupo de pesquisadores procurou investigar a expressão do RNAm da UCP-2 e da UCP-3 no período de recuperação após oito semanas de TF com ratos e encontrou diminuição da expressão dessas proteínas em ambos os músculos (sóleo e tibial anterior) (BOSS *et al.*, 1998). Pauli (2007), em outro trabalho, também demonstrou menor expressão de UCP-3 no músculo gastrocnêmio de animais destreinados. Tais adaptações metabólicas são fundamentais aos indivíduos fisicamente ativos, pois é através delas que o organismo se abastece e se protege contra um eventual dispêndio excessivo de energia, que pode vir a ocorrer em sessões subsequentes da rotina de treinamentos físicos. Por outro lado, as mesmas adaptações parecem ser desfavoráveis quando pessoas fisicamente ativas se tornam sedentárias, uma vez que, não acontecendo o maior dispêndio energético, favorecem a aquisição de maior peso corporal (PAULI, 2007).

Portanto, apesar de não investigarmos o comportamento do TAM, da atividade da LPL, do gasto energético de repouso e da expressão das UCP, é possível que alterações em um ou mais desses parâmetros tenham contribuído para que os animais do grupo DT apresentassem maior EM e, dessa forma, tivesse incremento do ganho de peso e do aumento de gordura corporal após a interrupção do TF, mesmo sem diferença no consumo alimentar entre os grupos, sugerindo que o DF desempenha papel importante no desenvolvimento da obesidade.

Vale ressaltar que o tecido adiposo é vital para a vida e sua integridade funcional é necessária para o equilíbrio no metabolismo corporal e para a manutenção de um organismo saudável. No entanto, o excesso de massa adiposa é potencialmente prejudicial e aumenta a incidência de comorbidades (GONZÁLEZ-PÉRIZ e CLÀRIA, 2010). Em particular, o aumento do tecido adiposo visceral (TAV) é associado com anormalidades na homeostase glicêmica, elevação de triacilgliceróis plasmáticos e redução no HDL, contribuindo para o aparecimento de diabetes tipo II e alterações cardiovasculares. (LAFONTAN e GIRARD, 2008). Além disso, o comportamento dos adipócitos ganha principal importância. Os adipócitos constituem o principal componente celular no tecido adiposo que armazena energia em forma de triacilgliceróis. Além disso, uma das suas funções é atuar como tampão, absorvendo AGL e triacilglicerídeos no período pós-prandial. Contudo, conforme ocorre o aumento do seu tamanho, os adipócitos tornam-se disfuncionais; por exemplo, tornam-se resistentes à insulina e hiperlipolíticos, contribuindo, assim, para alguns problemas relacionados com a obesidade (LAFONTAN e GIRARD, 2008). Craig *et al.* (1991) reportaram aumento do diâmetro de adipócitos de ratas após 7 e 14 dias de destreinamento físico, enquanto Matos-Neto (2011) relatou que o destreinamento físico induziu aumento no volume de adipócitos isolados do tecido adiposo periepídimal.

Contudo, um dos principais achados do presente trabalho foi que a RC evitou o ganho de peso e gordura corporal atribuído à interrupção do TF. É bastante claro o efeito da RC no controle da massa corporal. Nesse aspecto, uma vez adotada, a RC é capaz de promover balanço energético negativo (consumo calórico menor que o gasto energético total) e, assim, reduzir os estoques de gordura corporal. Baseado neste conceito, a redução do consumo de energia é componente chave no tratamento da obesidade, devido ao fato de diminuir as complicações causadas pelo excesso da adiposidade.

Pesquisas demonstram que, uma vez adotado o protocolo de RC, quase todos os animais perdem peso (YOU *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2011; DAVIDSON *et al.*, 2002). Entretanto, a redução de TAB é desproporcionalmente maior. Esse fator torna-se extremamente importante, tendo em vista o papel do TAB na regulação da homeostase energética e glicêmica (SPEAKMAN e MITCHELL, 2011). Além disso, evidências científicas sobre os efeitos da RC na fisiologia do tecido adiposo mostram que, com a perda de peso, em virtude da RC, acontece redução da massa do tecido adiposo, acompanhada pela concomitante redução do tamanho das células adiposas, contribuindo, dessa maneira, para melhora no perfil metabólico, através do aumento da expressão de proteínas envolvidas na mobilização de gordura (efeito lipolítico) e adipocitocinas envolvidas no metabolismo glicolítico e na sensibilidade à insulina (VIGUERIE *et al.*, 2005; ROSSMEISLOVÁ *et al.*, 2012).

Neste contexto, além de promover diminuição significativa no conteúdo de gordura corporal, observamos que a RC foi a única variável capaz de restringir a massa dos coxins adiposos EPI e RET (tabela 2). Esse resultado torna-se extremamente interessante, tendo em vista a participação da gordura visceral em alterações metabólicas que acarretam o comprometimento da saúde. Diante do exposto, sugerimos que a redução da adiposidade e as mudanças na morfologia do tecido adiposo sejam os principais mecanismos pelos quais a RC promova benefícios relacionados à saúde em animais submetidos ao DF. Alguns autores sugerem que os benefícios da RC vão além da redução da gordura corporal. Ratos que tiveram a gordura visceral cirurgicamente reduzida, e com oferta de ração *ad libitum*, demonstraram maior média de vida em relação a animais do grupo controle. No entanto, a média de vida desses animais não foi maior em relação aos ratos submetidos a 40% de RC (MUZUMDAR *et al.*, 2008).

A maioria das pesquisas que comprovam os benefícios da RC na composição corporal foi desenvolvida em animais ou humanos, obesos e/ou idosos. Dessa forma, o presente estudo foi o primeiro, em nosso conhecimento, a demonstrar que a RC previne o ganho de massa corporal e adiposidade durante o DF. Assim, parece-nos que os cuidados com a alimentação, quando ocorre o cessamento do exercício físico, são essenciais para a manutenção da massa corpórea.

Pelo fato de os animais não serem obesos, e sim estarem propensos à obesidade, devido às complicações causadas pelo DF, nós escolhemos um protocolo de RC relativamente brando (30% de RC), quando comparado com outros adotados na literatura científica, que podem chegar até 60% de RC, segundo Cerqueira e Kowaltowski (2010). Isso porque o objetivo era evitar o ganho de adiposidade, e não reduzir massa corpórea, uma vez que esses animais estavam magros, tendo em vista que tinham sido submetidos ao protocolo de TF por oito semanas. Para comprovar este fato, estudo prévio realizado em nosso laboratório demonstrou que oito semanas de TF foram capazes de reduzir a massa adiposa em relação ao grupo sedentário. Além disso, o TF promoveu aumento da MLG e reduziu o %G, quando comparado com animais que não praticaram exercício algum (MATOS-NETO, E.M. 2011). Contudo, observamos que os ratos do grupo DTRC foram os únicos animais que perderam peso ao longo das seis últimas semanas de experimento (figura 4 e 5). Até mesmo os animais do grupo TREIN, que estavam tendo gasto energético elevado, por conta do TF, ganharam 4% da massa corporal inicial, ao longo das 6 últimas semanas do experimento. Baseados nesses resultados, podemos sugerir que o protocolo adotado tenha sido relativamente severo para esses animais, ou seja, talvez 30% de RC tenham sido mais do que suficiente para evitar o ganho de gordura corporal excessivo em animais destreinados.

Alguns autores destacam que a RC severa pode provocar alterações deletérias que levam ao comprometimento da saúde. Dessa maneira, quando adotada rigorosamente, a RC pode ocasionar efeitos como: osteoporose, infertilidade, anemia, perda de massa muscular e déficits neurológicos (FONTANA e Klein, 2007; MERCKEN *et al.*, 2011).

No presente estudo, para garantir que a ingestão de nutrientes dos animais submetidos à RC fosse compatível à daqueles que foram alimentados *ad libitum* – e também para evitar a instalação de algum tipo de deficiência nutricional não intencional –, a ração oferecida aos animais do grupo DTRC foi modificada. Dessa forma, aumentamos a quantidade de alguns nutrientes proporcionalmente, conforme descrito por Pugh *et al.* (1999). Portanto, garantimos que a quantidade de nutrientes ingerida por todos os animais estava dentro das recomendações do *American Institute of Nutrition*. Contudo, nenhuma análise foi desenvolvida na perspectiva de investigar se o valor 30% de RC foi severo e, talvez, comprometedor da saúde desses animais. Por isso, mais estudos são necessários para investigar qual protocolo de RC é o menos severo e, ao mesmo tempo, seja capaz de minimizar os efeitos do DT.

Curiosamente, os resultados do trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório e os resultados apresentados no presente estudo indicam que as semanas iniciais são cruciais para o maior ganho de massa corporal promovido pelo DF. Portanto, acreditamos que o percentual de RC possa ser adequado para cada período de DF, possibilitando, assim, que houvesse ajuste gradual na oferta de ração ao longo do tempo. Desta maneira, evitar-se-ia uma severidade desnecessária e, acreditamos, inviável na prática clínica cotidiana.

O presente estudo demonstrou que, apesar de o protocolo de TF ter sido predominantemente aeróbio e de moderada intensidade, os animais do grupo TREIN apresentaram maior percentual de MLG no final do experimento. Consonante com nossos resultados, Matos-Neto (2011) encontrou que animais submetidos ao TF predominantemente aeróbio (corrida em esteira) apresentaram %MLG maior em relação aos demais grupos. É possível que adaptações metabólicas adquiridas ao longo do TF possam estar relacionadas com esses resultados. Modificações corporais, como aumento do tamanho dos músculos e consequente retenção de água, aumento na densidade capilar, aumento no conteúdo de mioglobina, aumento no número e tamanho das mitocôndrias e suas enzimas oxidativas, são importantes – principalmente para fazer com que o organismo consiga atender as demandas do exercício físico com mais facilidade e, portanto, contribuindo para o aumento da massa livre de gordura desses animais (WILLIAMS, 2002).

Em contraste, verificamos o que DF foi capaz de promover redução no %MLG. Esses resultados corroboram outras evidências científicas. Pesquisa desenvolvida recentemente em nosso laboratório constatou que animais, após interromperem o TF, apresentaram

redução na massa livre de gordura (MATOS-NETO, E.M. 2011). Em humanos, Petibois *et al.* (2004) observaram que o DF foi capaz de reduzir a massa corporal magra de atletas de *endurance*. Liu *et al.* (2008) constataram, em atletas de caiaque, que apenas 4 semanas de DF resultaram no aumento da circunferência abdominal (+1,73 cm), associado com a redução da massa corporal (1.075 g e IMC); esses autores especularam que o aumento da circunferência abdominal, sem a elevação da massa corporal, ocorreu devido ao acúmulo de gordura durante o período de DF, associado à redução de massa muscular esquelética.

Apesar de essas observações serem comumente encontradas em trabalhos que estudam modificações na composição corporal durante o DF, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda são pouco investigados. Entretanto, atualmente, vem crescendo o número de investigações sobre alterações no metabolismo proteico com a obesidade. Nesse sentido, tendo em vista que a obesidade é frequentemente associada com resistência à insulina, sugere-se o comprometimento da ação anabólica desse hormônio, afetando, assim, o metabolismo proteico (GUILLET *et al.*, 2010). Baseado nisso, pode-se concluir que animais predispostos à obesidade apresentem menor massa muscular, sendo associado com redução significativa na taxa da síntese proteica ou no comprometimento da incorporação de aminoácidos para o tecido muscular (DUNN *et al.*, 1980; DURSCHLANG *et al.*, 1983).

Possíveis mecanismos que explicariam esse processo são baseados na participação da insulina como reguladora do metabolismo proteico, através da via de uma proteína chave na síntese proteica, conhecida como Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR). Após a ligação da insulina, o seu receptor sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS). Uma vez ativada, a IRS modula a fosforilação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que, por sua vez, induz a fosforilação da Akt, também conhecida como proteína quinase B. A fosforilação da Akt indiretamente estimula a atividade da mTOR. A ativação dessa proteína resultará na fosforilação de outras proteínas importantes na via da síntese proteica, como 4-EBP1 e p70S6 quinase.

Com a finalidade de investigar o comprometimento dessa via de síntese proteica na obesidade, Katta *et al.* (2009), utilizando ratos Zucker (animais geneticamente predispostos à obesidade e à resistência a insulina), constataram que a ativação da via AKT-mTOR-p70S6 quinase, em resposta à estimulação elétrica de alta frequência (HFES), foi significativamente menor em relação a animais magros. Em camundongos induzidos à obesidade através da dieta, também foi constatada redução no crescimento muscular em animais submetidos à sobrecarga mecânica. É importante ressaltar que a atenuação na resposta de crescimento muscular, nos animais obesos, foi associada com redução na ativação da Akt e na fosforilação da p70S6 quinase (SITNICK *et al.*, 2009). Neste sentido, é

importante destacar que resistência à insulina induzida pela obesidade poderia também afetar o metabolismo proteico.

Em nosso estudo, não utilizamos nenhum modelo de obesidade. Contudo, a literatura aponta que o DF promove rápido aumento da massa adiposa, indicando, portanto, que esta condição pode constituir um estímulo para o desenvolvimento da obesidade (SHEPARD *et al.*, 2001). Ademais, vimos, no presente trabalho, que o DF promoveu aumento de gordura corporal, acompanhado pela redução na sensibilidade à insulina. Com base nessas evidências, apesar de não termos investigado a via Akt-mTOR-p70S6 quinase na musculatura esquelética, é possível que alterações no funcionamento normal dessa via possam ter comprometido a síntese muscular, resultando no menor %MLG encontrado nos animais destreinados. Portanto, mais estudos são necessários para investigar o efeito do DF no metabolismo proteico, principalmente sobre proteínas envolvidas na síntese muscular e na resistência à insulina.

Em nosso estudo, verificamos que não houve diferença na glicemia em jejum, bem como na variação relativa ($\Delta\%$) entre a oitava e décima terceira semana e, além disso, vimos que a variação da glicose sanguínea, em todos os grupos experimentais, encontrou-se dentro de uma faixa de normalidade (tabela 3). Entretanto, quando analisamos a ASC, do OGTT, constatamos que o grupo DTRC apresentou redução significativa, em comparação aos grupos DT e SED, referente ao teste realizado na décima terceira semana. Resultado semelhante foi encontrado quando calculamos o $\Delta\%$ ASC da oitava e da décima terceira semanas. Similarmente ao grupo DTRC, os animais que mantiveram o TF melhoraram a sensibilidade à insulina em relação aos grupos DT e SED (figura 10). Com base nesses resultados, podemos afirmar que o DF promoveu redução na sensibilidade à insulina e, em contraste, a intervenção nutricional adotada neste período foi capaz de prevenir esse efeito; e, ainda, seis semanas de RC foram capazes de promover aumento na sensibilidade desse hormônio.

Conforme os nossos resultados, diversos estudos apontam redução na sensibilidade à insulina no período de DF. Craig *et al.* (1991) verificaram que a captação e a oxidação de glicose em adipócitos isolados de ratos permaneceram elevadas por 7 dias e declinaram aos 14 e 21 dias após o DF. Em outro estudo, apenas 10 dias de interrupção do TF foram capazes de reduzir a sensibilidade desse hormônio em sujeitos fisicamente ativos (KING *et al.*, 1988), bem como em atletas de *endurance* (ARCIERO *et al.*, 1998). Adicionalmente, 6 dias de DF em corredores reduziram a ação da insulina associada ao decréscimo nos níveis da proteína transportadora de glicose no músculo esquelético (GLUT4) (VUKOVICH *et al.*, 1996). Em roedores, Kump & Booth (2005) relataram que dois dias de interrupção de atividade física espontânea promoveram diminuição no conteúdo da proteína GLUT4, no

músculo esquelético, além da redução na ativação da via de sinalização da insulina, através da redução da fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) e AKT.

Entretanto, na perspectiva de investigar possíveis medidas de intervenção a serem adotadas no período de interrupção do TF, verificamos que a RC foi efetiva na prevenção da resistência da ação da insulina em ratos destreinados. Já é bastante claro na literatura o impacto da RC sobre a sensibilidade à ação deste hormônio, principalmente em modelos experimentais como obesidade e envelhecimento. Com ratos idosos, 20 % de RC durante 8 meses reduziram a adiposidade visceral e a massa adiposa total; além disso, melhoraram a sensibilidade à insulina, associada com aumento da concentração plasmática de adiponectina e redução nas concentrações séricas de leptina (ESCRIVÁ *et al.*, 2007). Zheng *et al.* (2009), em estudo com ratos obesos *Zucker*, constataram que 20 semanas de 40% de RC promoveram redução significativa na massa corporal desses animais, acompanhada pelo aumento na sensibilidade à insulina, em comparação com ratos que foram mantidos no consumo de ração *ad libitum*. Nesse sentido, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que a adoção da RC durante o período de DF melhora a sensibilidade à insulina, tornando a adoção dessa estratégia nutricional uma excelente medida de prevenção nos efeitos deletérios do destreinamento físico.

Acreditamos que, apesar de o presente trabalho ter sido desenvolvido em ratos, os resultados aqui encontrados podem beneficiar, também, os seres humanos. Muito se conhece sobre os prejuízos, no metabolismo, bem como na composição corporal, em atletas e praticantes de atividade física, ocasionados pelo DF. Esses efeitos podem prejudicar não só a *performance*, através do aumento de gordura corporal e da redução da MLG, mas também a saúde, pela perda da sensibilidade à insulina, por exemplo. Neste contexto, Mitsuhashi *et al.* (2011) demonstraram que o DF aumenta o risco para síndrome metabólica em japoneses.

Dessa forma, acreditamos que a RC beneficiará aquelas pessoas que, por algum motivo, precisam interromper a prática de exercício físico, protegendo-se, principalmente, do ganho repentino de gordura corporal, bem como da redução na sensibilidade à insulina. Além disso, diversos estudos apontam os benefícios da RC na ação da insulina em humanos. Weiss *et al.* (2006) demonstraram que 20% de RC por 12 meses foram capazes de aumentar o índice de sensibilidade à insulina em humanos com sobrepeso. Em outro estudo, com obesos, sete meses de 30% de RC promoveram melhor ação na sinalização desse hormônio (AHMADI *et al.*, 2011).

A fim de investigar o impacto do aumento no tecido adiposo causado pelo DF e a sua relação com perda da sensibilidade à insulina, fizemos uma correlação entre a quantidade de gordura corporal e ASC da décima terceira semana (figura 11): encontramos correlação positiva e de moderada associação. Ou seja, quanto maior for depósito de gordura maior

será a perda de sensibilidade à insulina. Dessa forma, podemos sugerir que o DF promove o aumento de gordura corporal, através de diversas alterações metabólicas já discutidas anteriormente, enquanto que o aumento da adiposidade causa a redução na sensibilidade à insulina.

Tendo em vista a participação do tecido adiposo como órgão endócrino e, nesse aspecto, sua contribuição na homeostase glicêmica e na resistência à insulina, tornou-se necessário analisarmos concentrações séricas de citocinas e AGNE, bem como a expressão e a fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e na inflamação no tecido adiposo EPI. Quando observamos os resultados referentes às concentrações séricas de leptina, AGNE, TNF-alfa e adiponectina, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos TREIN, DT e SED. Entretanto, a RC foi capaz de promover redução significativa nas concentrações de leptina e AGNE, quando comparado com os demais grupos. Além disso, análises realizadas pela técnica *Western Blotting* mostraram que a fosforilação da PKC θ no resíduo 538 da treonina foi estatisticamente maior no grupo DT quando comparado com os grupos SED e TREIN; entretanto, o grupo DTRC foi estatisticamente menor em relação ao grupo DT. Adicionalmente, apesar de não ser encontrada diferença estatística, a média do grupo DTRC na fosforilação da JNK e da IKK foi menor quando comparado ao grupo DT.

Já é bastante clara a participação do tecido adiposo na resistência à ação da insulina. Nesse aspecto, evidências científicas demonstram que a deposição de triacilgliceróis nas gotículas de lipídios leva à hipertrofia dos adipócitos, podendo acarretar maior síntese e liberação de adipocinas, caracterizando a condição pró-inflamatória (DE FERRANTI e MOZAFFARIAN, 2008). Uma das principais adipocinas envolvidas na resistência à ação da insulina sintetizada pelo tecido adiposo é a TNF-alfa. Estudos demonstram que a produção excessiva dessa adipocina pelo TAB promove ativação de duas outras proteínas inflamatórias conhecidas como IKK β e JNK. Uma vez fosforiladas, essas proteínas são capazes de promover a inibição da fosforilação em tirosina da IR e IRS-1, promovendo a redução na sensibilidade à insulina.

Em nosso estudo, os valores séricos encontrados para TNF-alfa não diferiram entre os grupos. Contudo, não analisamos a expressão gênica dessa citocina, no tecido adiposo, para ver sua ação na inflamação local. Portanto, apesar de verificarmos redução na sensibilidade à insulina pelos animais do grupo DT, não é possível afirmar a real participação da TNF-alfa na resistência à insulina no tecido adiposo EPI.

Contudo, evidências científicas demonstram que concentrações elevadas de AGNE podem induzir resistência à insulina (BODEN *et al.*, 1991; BODEN *et al.*, 1997). Foi sugerido que AGNE pode causar redução na sensibilidade desse hormônio através da inibição de proteínas envolvidas na sinalização da insulina, que ocorre através da ativação de algumas proteínas inflamatórias (GRIFFIN *et al.*, 1999). O aumento da gordura promove a maior

liberação de AGNE para circulação e o subsequente consumo desse substrato pelos músculos, pelo fígado ou pelo tecido adiposo. Todavia, se a maior liberação de ácidos graxos a partir de adipócitos para a corrente sanguínea não for acompanhada de maior utilização destes, como substrato energético em outros tecidos, pode ocorrer acúmulo ectópico de triacilgliceróis (DELARUE e MAGNAN, 2007) ou também aumento na produção de substratos intermediários do metabolismo da gordura, como diacilgliceróis (DAG) e ceramidas e ácido fosfatídico. O acúmulo desses substratos pode ativar algumas proteínas inflamatórias e afetar negativamente a ação da insulina. Alguns estudos, realizados na tentativa de elucidar o papel dos AGNE e seus substratos na resistência à insulina, mostraram que os AGNE, diretamente ou através de seus intermediários metabólicos, como DAG, ácido fosfatídico e ceramidas, foram capazes de ativar a proteína serina quinase PKC θ , que tornou-se fosforilada no resíduo treonina. Uma vez fosforilada nesse resíduo, a PKC promove ativação da JNK e da IKK. Em conjunto, essas proteínas, associadas com a IRS-1, promoverão sua fosforilação em serina, seja em humanos ou em animais, comprometendo, por fim, a ação da insulina (GREENE *et al.*, 2003; GUAL *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2004; SCHENK *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, observamos que o DF foi capaz de promover aumento na fosforilação da PKC θ no resíduo treonina. Contudo, não encontramos diferenças entre a concentração sérica de AGL nos grupos DT, TREIN e SED; entretanto, não analisamos nenhum tipo de substrato intermediário do metabolismo dos lipídios. Por isso, especulamos que o aumento de algum metabólito de ácidos graxos possa ter promovido maior fosforilação da PKC, desencadeando uma cascata de fosforilação de proteínas inflamatórias, resultando no comprometimento da ação da insulina encontrado nos animais DT.

Em nosso conhecimento, nenhum estudo na literatura foi designado na tentativa de elucidar as vias moleculares envolvidas na resistência à ação da insulina durante o DF, tornando difícil a comparação dos nossos resultados com outros trabalhos. Contudo, um recente estudo, desenvolvido em nosso laboratório, que investigou os mesmos paradigmas do nosso trabalho, encontrou aumento na fosforilação da proteína PKC θ nos animais destreinados, em comparação ao grupo que continuou o programa de treinamento físico. Entretanto, diferentemente dos nossos resultados, os animais destreinados não apresentaram redução na sensibilidade à ação da insulina. Portanto, mais estudos com objetivo de investigar as vias inflamatórias envolvidas no DF são necessários para elucidar o papel dessas vias moleculares após a interrupção do treinamento físico.

Surpreendentemente, verificamos que a RC foi capaz de reduzir a fosforilação da PKC θ e, além disso, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística, observamos

que essa intervenção nutricional apresentou menor média na fosforilação de outras proteínas inflamatórias, como JNK e IKK, no tecido adiposo EPI de ratos destreinados.

A participação da proteína PKC θ no desenvolvimento da resistência à insulina vem sendo mostrada através de estudos desenvolvidos em camundongos *knockout*. Cinco horas após uma infusão de lipídios, foi observada redução na absorção de glicose em, aproximadamente, 50% dos camundongos selvagens estudados. Em contraste, nenhuma alteração foi encontrada na absorção de glicose pelo músculo em camundongos *knockout* para PKC θ , mostrando que a resistência à ação da insulina, induzida pelo excesso de gordura, pode ser prevenida com a inativação da PKC θ (KIM *et al.*, 2004).

Baseando-nos nessas informações, podemos sustentar que a redução na fosforilação em serina da PKC θ , ocasionada pela RC, foi fundamental para preservar a sensibilidade à insulina de animais do grupo DTRC. Além disso, com base nos conhecimentos construídos pela literatura científica, sugerimos que a redução na concentração de AGNE encontrada nos animais DTRC tenha sido o principal mecanismo envolvido na redução da fosforilação dessa proteína.

Diversos estudos têm, consistentemente, mostrado que a RC, sem desnutrição, aumenta a qualidade de vida de diferentes espécies, como leveduras, peixes e roedores (MASORO 2000, WEINDRUCH E SOHAL 1997). Múltiplos mecanismos são responsáveis pelos efeitos mediados pela RC, incluindo redução de radicais livres, melhora da sensibilidade à insulina e diminuição da inflamação (FONTANA e KLEIN 2007). Além disso, evidências científicas relatam que a perda de peso induzida pela RC reduz a infiltração e a ativação de macrófagos no tecido adiposo e, conseqüentemente, reduz a diminuição na inflamação sistêmica. A redução nos marcadores inflamatórios mediados pela perda de peso, em virtude da RC, está relacionada também com a melhora na sensibilidade à insulina e com as concentrações séricas de adipocinas (FONTANA *et al.*, 2009). Ao encontro com esses resultados, Crisóstomo *et al.* (2010) demonstraram que dois meses de 50% de RC, em ratos diabéticos, foram capazes de melhorar a sensibilidade à insulina desses animais. Além disso, os níveis de concentração da SAPK/JNK fosforiladas foram reduzidos com a RC.

Ainda no contexto da inflamação, nossos dados mostraram que os animais submetidos à RC foram os únicos a apresentarem redução na concentração sérica de leptina, indo ao encontro de demais trabalhos na literatura (SHIMOKAWA e HIGAMI. 1999; HIGAMI *et al.*, 2003; SPEAKMAN e MITCHELL 2012). Os mecanismos pelos quais as mudanças induzidas pela RC influenciam as concentrações de adipocinas permanecem obscuros, mas as evidências experimentais encontradas até aqui indicam que as alterações nas concentrações de leptina dependem predominantemente de reduções no tamanho dos adipócitos (MIYAZAKI *et al.*, 2010). Portanto, supomos que a redução no volume de

adipócitos ocorrida no grupo DTRC justifique as menores concentrações séricas de leptina entre estes animais.

Apesar de a musculatura esquelética ser o principal consumidor de glicose dependente da ação da insulina, estudo com camundongos *knockout* para o receptor deste hormônio no músculo demonstrou que esses animais apresentaram aumento na massa adiposa, na concentração sérica de triacilgliceróis e nos AGNE. Entretanto, a glicemia, a concentração sérica de insulina e a tolerância à glicose mantiveram-se normais (BRUNING *et al.*, 1998). Por outro lado, animais *knockout* para o transportador de glicose GLUT4 no tecido adiposo apresentaram intolerância à glicose e hiperinsulinemia; demonstrando, portanto, o papel crucial do tecido adiposo na regulação do metabolismo (ABEL *et al.*, 2001).

Tendo em vista os resultados encontrados em nosso trabalho, demonstrando a redução na sensibilidade à insulina nos animais DT, a melhora da ação desse hormônio em ratos do grupo DTRC e, paralelamente, os pressupostos adquiridos na literatura científica, no qual destaca-se a participação do tecido adiposo no quadro de resistência à ação da insulina, achamos de fundamental importância investigar uma proteína nodal envolvida na sinalização desse hormônio no TAB periepídimal.

Uma via que merece destaque no transporte de glicose estimulado pela insulina é a fosfatidilinositol 3-quinase/Proteína quinase B (PI3-K/Akt). Como resultado da ativação da PI3-K, ocorre fosforilação de uma proteína quinase denominada Akt que, dentre outras funções, participa diretamente do transporte de glicose dependente de insulina (KATOME *et al.*, 2003). Portanto, decidimos investigar a fosforilação da Akt no tecido adiposo, a fim de investigar se alguma alteração nessa via estaria comprometendo a captação normal da glicose no tecido adiposo.

Apesar de não ser estatisticamente significativo ($p = 0,08$), observamos que o grupo DT apresentou menor expressão da fosforilação da Akt, quando comparado ao grupo TREIN, sendo condizente com os resultados, já aqui demonstrados, da redução na sensibilidade à ação da insulina através do teste de OGTT e fosforilação em serina da PKC θ . Outros trabalhos na literatura também demonstram resultados semelhantes. Kump e Booth (2005) observaram que a interrupção do TF é acompanhada por diminuição da expressão do receptor de insulina (IR), da fosforilação em tirosina do IR, da fosforilação da Akt e da concentração de GLUT-4, após estímulo com insulina em músculo esquelético. Baseados nos nossos resultados, acreditamos que o aumento na fosforilação em serina da PKC θ , acompanhado pela menor fosforilação na proteína Akt no tecido adiposo EPI, foram os principais fatores que levaram os animais dos grupos DT a apresentarem menor sensibilidade à ação insulina do que os animais do grupo TREIN.

Entretanto, apesar de o grupo DTRC apresentar aumento na sensibilidade à insulina e menor expressão de proteínas inflamatórias no TAB em relação ao grupo DT, observamos

menor fosforilação da Akt nos animais submetidos à RC. Uma vez fosforilada, a Akt promove diferentes ações metabólicas no tecido adiposo, no músculo e no fígado. Especificamente no tecido adiposo, essa proteína inicia ações no metabolismo, como aumento na captação de glicose e na síntese proteica e, além disso, aumento na lipogênese. Em contraste, a fosforilação da Akt nesse tecido resulta na redução da lipólise (CAPURSO e CAPURSO 2012).

Por outro lado, a RC promove redução no tamanho dos adipócitos, conseqüente da redução do conteúdo de triacilglicerol (TGL) nas células adiposas. Os TGL são mobilizados no TAB através de um processo lipolítico, gerando AGNE e glicerol para circulação. Numa situação de balanço energético negativo, os AGNE servem de substrato energético para os músculos esqueléticos, o fígado e o miocárdio (ROSSMEISLOVÁ *et al.*, 2012). Sendo assim, podemos perceber que, em uma situação de déficit calórico, o tecido adiposo passa a ter papel de fornecedor de energia para a manutenção saudável de outros órgãos. Portanto, a redução na fosforilação da Akt, no tecido adiposo, e, com isso, o aumento da lipólise e a redução da lipogênese são adaptações naturais e essenciais para sobrevivência durante a situação de RC. Além disso, esse mecanismo explica a redução na concentração de AGL encontrado no grupo DTRC.

No entanto, a literatura aponta que a RC pode aumentar a sensibilidade à insulina e a captação de glicose, através do aumento da fosforilação da Akt na musculatura esquelética (SHARMA *et al.*, 2011). Sendo assim, é provável que o efeito da RC na fosforilação da Akt seja tecido-dependente.

Esses dados, analisados em conjunto, indicam que o DF promove severas alterações celulares e metabólicas, promovendo um quadro de inflamação crônica bastante similar àquelas encontradas em patologias, tais como, obesidade e diabetes tipo 2, entre outras, e que o TAB visceral tem papel fundamental nesse processo. Interessantemente, a estratégia de RC foi efetiva em prevenir estes efeitos adversos, constituindo-se, portanto, uma importante ferramenta nutricional que poderá ser adotada em situações de DF.

8. CONCLUSÃO

Baseando-nos nos resultados encontrados no presente trabalho, podemos concluir que o destreinamento físico, quando acompanhado com consumo de ração *ad libitum*, promoveu rápido aumento de massa corporal e adiposidade, levando à redução na sensibilidade à insulina. Além disso, o DF representou uma condição inflamatória, através do aumento da expressão da fosforilação em serina da PKC θ , no tecido adiposo epididimal, e do aumento da concentração sérica de leptina.

Por outro lado, a RC foi capaz de prevenir os efeitos deletérios ocasionados pela interrupção do treinamento físico. Nesse particular, a intervenção nutricional aqui adotada evitou o ganho de peso, além de reduzir os estoques de gordura corporal. Ademais, a restrição energética aumentou a sensibilidade à insulina e reduziu os marcadores inflamatórios de ratos destreinados.

Com bases nesses achados, sugerimos que novos estudos sobre o tema analisem outros tecidos e/ou órgãos, além de outros coxins adiposos; analisando, também, outras situações experimentais, como diferentes percentuais de RC, bem como o tempo necessário a ser adotado nessa intervenção nutricional, visto a dificuldade de se manter uma dieta com baixa ingestão energética por longo tempo.

Por fim, acreditamos que os cuidados nutricionais adotados após a cessação do TF sejam de fundamental importância para prevenir os efeitos deletérios do destreinamento físico.

REFERÊNCIAS

ABEL, E.D.; PERONI, O.; KIM, J.K.; KIM, Y.B.; BOSS, O.; HADRO, E.; MINNEMANN, T.; SHULMAN, G.I.; KAHN, B.B. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, v.409, n.6821, p.729-733, 2001.

AHMADI, N.; ESHAGHIAN, S.; HUIZENGA, R.; SOSNIN, K.; EBRAHIMI, R.; SIEGEL, R. Effects of intense exercise and moderate caloric restriction on cardiovascular risk factors and inflammation. **American Journal of Medicine**, v.124, n.10, p.978-982, 2011.

APPLEGATE, E.A.; UPTON, D.E.; STERN, J.S. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. **Journal of Nutrition**, v.114, n.2, p.447-459, 1984.

ARCIERO, P.J.; GENTILE, C.L.; MARTIN-PRESSMAN, R.; ORMSBEE, M.J.; EVERETT, M.; ZWICKY, L.; STEELE, C.A. Increased dietary protein and combined high intensity aerobic and resistance exercise improves body fat distribution and cardiovascular risk factors. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.16, n.4, p.373-392, 2006.

ARCIERO, P.J.; SMITH, D.L.; CALLES-ESCANDON, J. Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. **Journal of Applied Physiology**, v.84, n.4, p.1365-1373, 1998.

ARCIERO, P.J.; VUKOVICH, M.D.; HOLLOSZY, J.O.; RACETTE, S.B.; KOHRT, W.M. Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance. **Journal of Applied Physiology**, v.86, n.6, p.1930-1935, 1999.

ARNOLD, J.; RICHARD, D. Detraining of exercise-trained rats: effects on energetic efficiency and brown adipose tissue thermogenesis. **British Journal of Nutrition**, v.57, n.3, p.363-370, 1987.

BAO, S.; KENNEDY, A.; WOJCIECHOWSKI, B.; WALLACE, P.; GANAWAY, E.; GARVEY, W.T. Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. **Diabetes**, v.47, p.1935-1940, 1998.

BARZILAI, N.; BANERJEE, S.; HAWKINS, M.; CHEN, W.; ROSSETTI, L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.7, p.1353-1361, 1998.

BERGMEYER, H.U. Standardization of the reaction temperature for the determination of enzyme activity. **Zeitschrift fuer Klinische Chemie und Klinische Biochemie**, v.11, n.1, p.39-45, 1973.

BERTAGNOLLI, M.; CAMPO, C.; SCHENKEL, P.C.; OLIVEIRA, V.L.; DE ANGELIS, K.; BELLO-KLEIN, A.; RIGATTO, K.; IRIGOYEN, M.C. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v.12, p.2437-2443, 2006.

BOCALINI, D.S.; CARVALHO, E.V.; SOUSA, A.F.; LEVY, R.F.; TUCCI, P.J. Exercise training induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v.109, n.5, p.909-914, 2010.

BOCALINI, D.S.; SERRA, A.J.; RICA, R.L.; SANTOS, L. Repercussions of training and detraining by water-based exercise on functional fitness and quality of life: a short-term follow-up in healthy older women. **Clinics**, v.65, n.12, p.1305-1309, 2010.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v.46, p.3–10, 1997.

BODEN, G.; JADALI, F.; WHITE, J.; LIANG, Y.; MOZZOLI, M.; CHEN, X.; COLEMAN, E.; SMITH, C. Effects of fat on insulin stimulated carbohydrate metabolism in normal men. **Journal of Clinical Investigation**, v.88, p.960–966, 1991.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.68, n.2, p.374–378, 1989.

BORGES-SILVA, C.N.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; PERES, S.B.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T.C.; LIMA, F.B. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuate aerobic power adaptability in trained rats. **Journal of Pineal Research**, v.43, n.1, p.96-103, 2007.

BOSS, O.; HAGEN, T.; LOWELL, B.B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. **Diabetes**, v.49, p.143-156, 2000.

BOSS, O.; SAMEC, S.; DESPLANCHES, D.; MAYET, M.H.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J.P. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. **Faseb Journal**, v.12, p.335-339, 1998.

BOWMAN, T.A.; RAMAKRISHNAN, S.K.; KAW, M.; LEE, S.J.; PATEL, P.R.; GOLLA, V.K.; BOUREY, R.E.; HARAM, P.M.; KOCH, L.G.; BRITTON, S.L.; WISLØFF, U.; LEE, A.D.; NAJJAR, S.M. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance and steatosis in rats with low aerobic capacity. **Endocrinology**, v.151, n.11, p.5157-5164, 2010.

BRÜNING, J.C.; MICHAEL, M.D.; WINNAY, J.N.; HAYASHI, T.; HÖRSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L.J.; KAHN, C.R. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. **Molecular Cell**, v.2, n.5, p.559-569, 1998.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, v.57, n.2/4, p.91-97, 2012.

CERQUEIRA FM, KOWALTOWSKI AJ. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing Research Reviews**, v.9, n.4, p.424-430, 2010.

CHEN, Y.R.; FANG, S.R.; FU, Y.C.; ZHOU, X.H.; XU, M.Y.; XU, W.C. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. **Biochemistry and Cell Biology**, v.88, n.4, p.715-722, 2010.

CHEN, Y.R.; FANG, S.R.; FU, Y.C.; ZHOU, X.H.; XU, M.Y.; XU, W.C. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. **Biochemistry and Cell Biology**, v.88, n.4, p.715-722, 2010.

CONVERTINO, V.A.; SANDLER, H.; WEBB, P.; ANNIS, J.F. Induced venous pooling and cardiorespiratory responses to exercise after bed rest. **Journal of Applied Physiology**, v.52, n.5, p.1343-1348, 1982.

COYLE, E.F. Destreinamento e retenção das adaptações induzidas pelo treinamento. In: AMERICAN COLLEGE OF SPORT MEDICINE. **Prova de esforço e prescrição de exercício**. Rio de Janeiro, Revinter, 1994. cap.12, p.80-86.

COYLE, E.F.; MARTIN, W.H.; SINACORE, D.R.; JOYNER, M.J.; HAGBERG, J.M.; HOLLOSZY, J.O. Time course of loss of adaptations after stopping prolonged intense endurance training. **Journal of Applied Physiology**, v.57, n.6, p.1857-1864, 1984.

CRAIG, B.W.; MARTIN, G.; BETTS, J.; LUNGREN, M.; LAMBRET, V.; KAISERAUER, S. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.57, n.1, p.49-61, 1991.

CRAIG, B.W.; THOMPSON, K.; HOLLOSZY, J.O. Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. **Journal of Applied Physiology**, v.54, n.2, p.571-575, 1983.

CRISOSTOMO, J. ; RODRIGUES, L.; MATAFOME, P.; AMARAL, C.; NUNES, E.; LOURO, T.; MONTEIRO, P.; SEIÇA, R. Beneficial effects of dietary restriction in type 2 diabetic rats: the role of adipokines on inflammation and insulin resistance. **British Journal of Nutrition**, v.104, n.1, p.76-82, 2010.

DAVIDSON, R.T.; ARIAS, E.B.; CARTEE, G.D. Calorie restriction increases muscle insulin action but not IRS-1-, IRS-2-, or phosphotyrosine-PI 3-kinase. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.282, n.2, p.E270-E276, 2002.

DE ANGELIS, K.L.; OLIVEIRA, A.R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L.R.; GADONSKI, G.; LACCHINI, S.; FERNANDES, T.G.; IRIGOYEN, M.C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocind diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.6, p.635-641, 2000.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clinical Chemistry**, v.54, n.6, p.945-955, 2008.

DEAN, D.J.; CARTEE, G.D. Brief dietary restriction increases skeletal muscle glucose transport in old Fischer 344 rats. **Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.51, n.3, p.B208-B213, 1996.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.10, n.2, p.142-148, 2007.

DIEHL, A.M.; HOEK, J.B. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.31, p.493-506, 1999.

DING, Q.; ASH, C.; MRACEK, T.; MERRY, B.; BING, C. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulating adiponectin in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, n.8, p.867-874, 2011.

DONATO Jr., J.; PEDROSA, R.G.; CRUZAT, V.F.; PIRES, I.S.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition**, v.22, n.5, p.520-527, 2006.

DUBE, J.J.; ALLISON, K.F.; ROUSSON, V.; GOODPASTER, B.H.; AMATI, F. Exercise dose and insulin sensitivity: relevance for diabetes prevention. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.44, n.5, p.793-799, 2012.

DUNN, M.A.; HARTSOOK, E.W. Comparative amino acid and protein metabolism in obese and non-obese Zucker rats. **Journal of Nutrition**, v.110, n.9, p.1865-1879, 1980.

DURSCHLAG, R.P.; LAYMAN, D.K. Skeletal muscle growth in lean and obese Zucker rats. **Growth**, v.47, n.3, p.282-291, 1983.

ESCRIVA, F.; GAVETE, M.L.; FERMÍN, Y.; PÉREZ, C.; GALLARDO, N.; ALVAREZ, C.; ANDRÉS, A.; ROS, M.; CARRASCOSA, J.M. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. **Journal of Endocrinology**, v.194, n.1, p.131-141, 2007.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C. Efeitos do destreinamento físico sobre a “performance” do atleta: uma revisão das alterações cardiovasculares e músculo-esqueléticas. **Revista Paulista de Educação Física**, v.13, n.2, p.239-249, 1999.

FAIGENBAUM, A.D.; WESTCOTT, W.L.; MICHELI, L.J.; OUTERBRIDGE, A.R.; LONG, C.J.; LAROSA-LOUD, R.; ZAICHKOWSKY, L.D. The effects of strength training and detraining on children. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.10, n.2, p.109-114, 1996.

FAROOQI, I.S.; MATARESE, G.; LORD, G.M.; KEOGH, J.M.; LAWRENCE, E.; AGWU, C.; SANNA, V.; JEBB, S.A.; PERNA, F.; FONTANA, S.; LECHLER, R.I.; DEPAOLI, A.M.; O'RAHILLY, S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, n.8, p.1093-1103, 2002.

FATOUROS, I.G.; TOURNIS, S.; LEONTSINI, D.; JAMURTAS, A.Z.; SXINA, M.; THOMAKOS, P.; MANOUSAKI, M.; DOUROUDOS, I.; TAXILDARIS, K.; MITRAKOU, A. Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, n.11, p.5970-5977, 2005.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.5, suppl., p.S192-S203, 2007.

FONTANA, L. Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction. **Experimental Gerontology**, v.44, n.1/2, p.41-45, 2009.

FONTANA, L.; KLEIN, S. Aging, adiposity, and calorie restriction. **JAMA, the Journal of the American Medical Association**, v.297, n.9, p.986-994, 2007.

FROSIG, C.; ROSE, A.J.; TREEBAK, J.T.; KIENS, B.; RICHTER, E.A.; WOJTASZEWSKI, J.F. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. **Diabetes**, v.56, n.8, p.2093-2102, 2007.

GAO, Z.; ZHANG, X.; ZUBERI, A.; HWANG, D.; QUON, M.J.; LEFEVRE, M.; YE, J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v.18, p.2024-2034, 2004.

GÓMEZ-AMBROSI, J.; RODRÍGUEZ, A.; CATALÁN, V.; FRÜHBECK, G. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. **Revista Española de Obesidad**, v.6, n.5, p.264-279, 2008. [Revisión].

GONZALEZ-PERIZ, A.; CLARIA, J. Resolution of adipose tissue inflammation. **Scientific World Journal**, v.10, p.832-856, 2010.

GREENE, M.W.; SAKAUE, H.; WANG, L.; ALESSI, D.R.; ROTH, R.A. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.10, p.8199–8211, 2003.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CLINE, G.W.; BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L.J.; KRAEGEN, E.W.; WHITE, M.F.; SHULMAN, G.I. Free fatty acid-induced insulin re-sistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes**, v.48, p.1270–1274, 1999.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CLINE, G.W.; BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L.J.; KRAEGEN, E.W.; WHITE, M.F.; SHULMAN, G.I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes**, v.48, p.1270-1274, 1999.

GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v.87, n.1, p.99–109, 2005.

GUILLET C, MASGRAU A, BOIRIE Y. Is protein metabolism changed with obesity? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.14, n.1, p.89-92, 2011.

HIGAMI, Y.; PUGH, T.D.; PAGE, G.P.; ALLISON, D.B.; PROLLA, T.A.; WEINDRUCH, R. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. **FASEB Journal**, v.18, n.2, p.415-417, 2003.

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

HOWLETT, K.F.; HOWLETT, K.F.; SAKAMOTO, K.; HIRSHMAN, M.F.; ASCHENBACH, W.G.; DOW, M.; WHITE, M.F.; GOODYEAR, L.J. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, v.51, n.2, p.479-483, 2002.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.6, p.1494-1505, 2006.

KATOME, T.; OBATA, T.; MATSUSHIMA, R.; MASUYAMA, N.; CANTLEY, L.C.; GOTOH, Y.; KISHI, K.; SHIOTA, H.; EBINA, Y. Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.30, p.28312-28323, 2003.

KATTA, A.; KARKALA, S.K.; WU, M.; MEDURU, S.; DESAI, D.H.; RICE, K.M.; BLOUGH, E.R. Lean and obese Zucker rats exhibit different patterns of p70s6 kinase regulation in the tibialis anterior muscle in response to high-force muscle contraction. **Muscle & Nerve**, v.39, n.4, p.503-511, 2009.

KIM, J.K.; FILLMORE, J.J.; SUNSHINE, M.J.; ALBRECHT, B.; HIGASHIMORI, T.; KIM, D.W.; LIU, Z.X.; SOOS, T.J.; CLINE, G.W.; O'BRIEN, W.R.; LITTMAN, D.R.; SHULMAN, G.I. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.6, p.823-827, 2004.

KING, D.S.; DALSKY, G.P.; CLUTTER, W.E.; YOUNG, D.A.; STATEN, M.A.; CRYER, P.E.; HOLLOSZY, J.O. Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. **Journal of Applied Physiology**, v.64, n.5, p.1942-1946, 1988.

KUMP, D.S.; BOOTH, F.W. Sustained rise in triacylglycerol synthesis and increased epididymal fat mass when rats cease voluntary wheel running. **Journal of Physiology**, v.565, pt.3, p.911-925, 2005.

LAFONTAN, M.; GIRARD, J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. **Diabetes & Metabolism**, v.34, n.4, pt.1, p.317-327, 2008.

LAMBERT, E.V.; WOODING, G.; LAMBERT, M.I.; KOESLAG, J.H.; NOAKES, T.D. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. **Journal of Applied Physiology**, v.77, n.6, p.2564-2571, 1994.

LARSON-MEYER, D.E.; HEILBRONN, L.K.; REDMAN, L.M.; NEWCOMER, B.R.; FRISARD, M.I.; ANTON, S.; SMITH, S.R.; ALFONSO, A.; RAVUSSIN, E. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. **Diabetes Care**, v.29, n.6, p.1337-1344, 2006.

LAYE, M.J.; THYFAULT, J.P.; STUMP, C.S.; BOOTH, F.W. Inactivity induces increases in abdominal fat. **Journal of Applied Physiology**, v.102, n.4, p.1341-1347, 2007.

LEE, I.S.; SHIN, G.; CHOUE, R. A 12-week regimen of caloric restriction improves levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in Korean women with BMIs greater than 23 kg/m². **Inflammation Research**, v.59, n.5, p.399-405, 2010.

LEHNEN, A.M.; LEGUISAMO, N.M.; PINTO, G.H.; MARKOSKI, M.M.; DE ANGELIS, K.; MACHADO, U.F.; SCHAAN, B. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovascular Diabetology**, v.9, p.1-8, 2010.

LIU, T.C.; LIU, Y.Y.; LEE, S.D.; HUANG, C.Y.; CHIEN, K.Y.; CHENG, I.S.; LIN, C.Y.; KUO, C.H. Effects of short-term detraining on measures of obesity and glucose tolerance in elite athletes. **Journal of Sports Sciences**, v.26, n.9, p.919-925, 2008.

LORENZO, M.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; VILA-BEDMAR, R.; GARCIA-GUERRA, L.; DE ALVARO, C.; NIETO-VAZQUEZ, I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14, suppl., p.E94-E104, 2008.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R.; CARVALHEIRA, J.B.; PERES, S.B.; REIS, M.A.; SAAD, M.J.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, n.1, p.149-157, 2002.

MARINI, M.; FALCIERI, E.; MARGONATO, V.; TRERÉ, D.; LAPALOMBELLA, R.; DI TULLIO, S.; MARCHIONNI, C.; BURATTINI, S.; SAMAJA, M.; ESPOSITO, F.; VEICSTEINAS, A. Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. **Histochemistry and Cell Biology**, v.129, n.4, p.479-487, 2008.

- MARTIN, B.; MATTSON MP.; MAUDSLEY S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. **Ageing Research Reviews**, v.5, n.3, p.332-353, 2006.
- MASORO, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.126, p.913-922, 2005.
- MATOS-NETO, E.M. **Suplementação crônica de leucina não impede a condição pró-inflamatória do destreinamento físico**. São Paulo, 2011. 114p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- MATOS-NETO, E.M. Suplementação crônica de leucina não impede a condição pró-inflamatória do destreinamento físico. São Paulo, 2011. 114p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- MATTSON, M.P. Energy intake, meal frequency and health: a neurobiological perspective. **Annual Review of Nutrition**, v.25, p.237-260, 2005.
- MCCURDY, C.E.; DAVIDSON, R.T.; CARTEE, G.D. Brief calorie restriction increases Akt2 phosphorylation in insulin-stimulated rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.285, n.4, p.E693-E700, 2003.
- MERCKEN, EM.; CARBONEAU, BA.; KRZYSIK-WALKER, SM.; CABO, R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. **Ageing Research Reviews**, v.11, n.3, p.390-398, 2012.
- MITSUHASHI, T.; YAMADA, C.; IIDA, A.; HIRATSUKA, N.; INABE, F.; ARAIDA, N.; MORIYAMA, K.; SASAMORI, H.; SASAMORI, N.; MIYACHI, M.; TAKAHASHI, E. Long-term detraining increases the risk of metabolic syndrome in Japanese men. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v.36, n.4, p.95-99, 2011.
- MIYAZAKI, S.; IZAWA, T.; OGASAWARA, J.E.; SAKURAI, T.; NOMURA, S.; KIZAKI, T.; OHNO, H.; KOMABAYASHI, T. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. **Life Sciences**, v.86, n.17/18, p.691-698, 2010.
- MRAZ, M.; LACINOVA, Z.; DRAPALOVA, J.; HALUZIKOVA, D.; HORINEK, A.; MATOULEK, M.; TRACHTA, P.; KAVALKOVA, P.; SVACINA, S.; HALUZIK, M. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.96, n.4, p.E606-E613, 2011.
- MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. **Sports Medicine**, v.30, n.2, p.79-87, 2000.
- MUZUMDAR, R.; ALLISON, D.B.; HUFFMAN, D.M.; MA, X.; ATZMON, G.; EINSTEIN, F.H.; FISHMAN, S.; PODUVAL, A.D.; MCVEI, T.; KEITH, S.W.; BARZILAI, N., Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. **Ageing Cell**, v.7, p.438-440, 2008.
- ORMSBEE, M.J.; ARCIERO, P.J. Detraining Increases body fat and weight and decreases VO₂peak and metabolic rate. **Journal of Strength & Conditioning Research**, v.26, n.8, 2087-2095, 2012
- OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.2, p.85-97, 2011.

PAULI, J.R. **Efeitos do destreinamento e da dieta hiperlipídica nos mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulina.** Campinas: [s.n.], 2007. pag. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas Universidade Estadual de Campinas.

PERES, S.B.; MORAES, S.M.; COSTA, C.E.; BRITO, L.C.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M.A.; ALONSO-VALE, M.I.; BORGES-SILVA, C.N.; LIMA, F.B. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **Journal of Applied Physiology**, v.98, n.3, p.1037-1043, 2005.

PETIBOIS, C.; CASSAIGNE, A.; GIN, H.; DÉLÉRIS, G. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.7, p.3377-3384, 2004.

PUGH, T.D.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH, R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. **Neurobiology of Aging**, v.20, n.2, p.157-165, 1999.

REDMAN, L.M.; HUFFMAN, K.M.; LANDERMAN, L.R.; PIEPER, C.F.; BAIN, J.R.; MUEHLBAUER, M.J.; STEVENS, R.D.; WENNER, B.R.; KRAUS, V.B.; NEWGARD, C.B.; KRAUS, W.E.; RAVUSSIN, E. Effect of caloric restriction with and without exercise on metabolic intermediates in nonobese men and women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.96, n.2, p.E312-E321, 2011.

REDMAN, L.M.; MARTIN, C.K.; WILLIAMSON, D.A.; RAVUSSIN, E. Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes. **Physiology & Behavior**, v.94, n.5, p.643-648, 2008.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **Journal of Nutrition**, v.127, p.S838-S841, 1997.

RESELAND, J.E.; ANDERSSON, S.A.; SOLVOLL, K.; HJERMANN, I.; URDAL, P.; HOLME, I.; DREVON, C.A. Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.240-245, 2001.

RODNICK, K.J.; SLOT, J.W.; STUDELSKA, D.R.; HANPETER, D.E.; ROBINSON, L.J.; GEUZE, H.J.; JAMES, D.E. Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.9, p.6278-6285, 1992.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D.M.; MOSTARDA, C.T.; HEEREN, M.V.; IRIGOYEN, M.-C.; DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v.6, n.38, p.1-7, 2007.

ROSSMEISLOVÁ, L.; MALIŠOVÁ, L.; KRAČMEROVÁ, J.; STICH, V. Adaptation of human adipose tissue to hypocaloric diet. **International Journal of Obesity**, p.1-11, May 29 2012. Disponível em: <http://www.nature.com/ijo/journal/vaop/ncurrent/pdf/ijo201280a.pdf>. Acesso em: 17 janeiro de 2013

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: ??? **Molecular cloning**. 2.ed. Plainview: Cold Spring Harbor, 1989. p.174-184.

SCHEFER, V.; TALAN, M.I. Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. **Experimental Gerontology**, v.3, p.387-392, 1996.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.2992–3002, 2008.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M.K. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, p.287-292, 2004.

SHARMA, N.; ARIAS, E.B.; BHAT, A.D.; SEQUEA, D.A.; HO, S.; CROFF, K.K.; SAJAN, M.P.; FARESE, R.V.; CARTEE, G.D. Mechanisms for increased insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in fast- and slow-twitch skeletal muscles of calorie-restricted rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.300, n.6, p.E966-E978, 2011.

SHARMA, N.; ARIAS, E.B.; BHAT, A.D.; SEQUEA, D.A.; HO, S.; CROFF, K.K.; SAJAN, M.P.; FARESE, R.V.; CARTEE, G.D. Mechanisms for increased insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in fast- and slow-twitch skeletal muscles of calorie-restricted rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.300, n.6, p.E966-E978, 2011.

SHEPARD, T.Y.; WEIL, K.M.; SHARP, T.A.; GRUNWALD, G.K.; BELL, M.L.; HILL, J.O.; ECKEL, R.H. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.4, p.703-708, 2001.

SHIMOKAWA, I.; HIGAMI, Y. A role for leptin in the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis. **Aging: Clinical and Experimental Research**, v.11, p.380–382, 1999.

SIMSOLO, R.B.; ONG, J.M.; KERN, P.A. The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, n.5, p.2124-2130, 1993.

SITNICK, M.; BODINE, S.C.; RUTLEDGE, J.C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **Journal of Physiology**, v.587, pt.23, p.5753-5765, 2009.

SMITH, J.V.; HEILBRONN, L.K.; RAVUSSIN, E. Energy restriction and aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.7, n.6, p.615-622, 2004.

SOUZA, S.B.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; SOUZA, L.E.; IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension**, v.50, n.4, p.786-791, 2007.

SPEAKMAN, J.R.; MITCHELL, S.E. Caloric restriction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.32, n.3, p.159-221, 2011. [Review].

STUBBS, R.J. ; HUGHES, D.A.; JOHNSTONE, A.M.; HORGAN, G.W.; KING, N.; BLUNDELL, J.E. A decrease in physical activity affects appetite, energy, and nutrient balance in lean men feeding ad libitum. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.1, p.62-69, 2004.

SUZUKI G.S. Adiponectina é um promissor marcador precoce da síndrome metabólica. **Diabetes Clínica**, v.6, p.419-427, 2005.

TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KAWAGUCHI, T.; KANDA, H.; KASUGA, M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**, v.151, n.3, p.971-979, 2010.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular Medicine**, v.14, n.3/4, p.222-231, 2008.

TORRES-LEAL, F.L.; CAPITANI, M.D.; TIRAPEGUI, J. The effect of physical exercise and caloric restriction on the components of metabolic syndrome. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.3, p.379-399, 2009.

UGOCHUKWU, N.H.; FIGGERS, C.L. Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, n.2, p.120-126, 2007.

VIGUERIE, N.; VIDAL, H.; ARNER, P.; HOLST, C.; VERDICH, C.; AVIZOU, S.; ASTRUP, A.; SARIS, W.H.; MACDONALD, I.A.; KLIMCAKOVA, E.; CLÉMENT, K.; MARTINEZ, A.; HOFFSTEDT, J.; SØRENSEN, T.I.; LANGIN, D.; NUTRIENT-GENE INTERACTIONS IN HUMAN OBESITY--IMPLICATIONS FOR DIETARY GUIDELINE (NUGENOB) PROJECT. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. **Diabetologia**, v.48, n.1, p.123-131, 2005.

VOLAKLIS, K.A.; DOUDA, H.T.; KOKKINOS, P.F.; TOKMAKIDIS, S.P. Physiological alterations to detraining following prolonged combined strength and aerobic training in cardiac patients. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v.13, n.3, p.375-380, 2006.

VUKOVICH, M.D.; ARCIERO, P.J.; KOHRT, W.M.; RACETTE, S.B.; HANSEN, P.A.; HOLLOSZY, J.O. Changes in insulin action and GLUT-4 with 6 days of inactivity in endurance runners. **Journal of Applied Physiology**, v.80, n.1, p.240-244, 1996.

WEINDRUCH, R.; SOHAL, R.S. Caloric intake and aging. **New England Journal of Medicine**, v.337, p.986-994, 1997.

WEISS, E.P. ; RACETTE, S.B.; VILLAREAL, D.T.; FONTANA, L.; STEGER-MAY, K.; SCHECHTMAN, K.B.; KLEIN, S.; HOLLOSZY, J.O.; WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE CALERIE GROUP. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.84, n.5, p.1033-1042, 2006.

WICHI, R.; MALFITANO, C.; ROSA, K.; SOUZA, S.B.; SALEMI, V.; MOSTARDA, C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.-C. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. **Cardiovascular Diabetology**, v.6, n.14, p.1-7, 2007.

WILLIMANS, M. **Nutrição para saúde condicionamento físico e desempenho esportivo**. 5.ed. São Paulo: Manole, 2002. p.360-384.

WOO, J.; SHIN, K.O.; YOO, J.H.; PARK, S.; KANG, S. The effects of detraining on blood adipokines and antioxidant enzyme in Korean overweight children. **European Journal of Pediatrics**, v.17, n.2, p.235-243, 2012.

XYDAKIS, A.M.; CASE, C.C.; JONES, P.H.; HOOGEVEEN, R.C.; LIU, M.Y.; SMITH, E.O.; NELSON, K.W.; BALLANTYNE, C.M. Adiponectin, inflammation, and the expression of the

metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.6, p.2697-2703, 2004.

YAMASHITA, A.S. ; LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; PAULINO, E.C.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; SANTOS, R.V.; BATISTA JR., M.L.; NASCIMENTO, C.O.; OYAMA, L.M.; SEELAENDER, M. Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: the effect of aerobic training and energy restriction. **Cytokine**, v.52, n.3, p.168-74, 2010.

You, T.; SONNTAG, W.E.; LENG, X.; CARTER, C.S. Lifelong caloric restriction and interleukin-6 secretion from adipose tissue: effects on physical performance decline in aged rats. **Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.62, n.10, p.1082-1087, 2007.

ZHENG, Y.; ZHANG, W.; PENDLETON, E.; LENG, S.; WU, J.; CHEN, R.; SUN, X.J. Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. **Journal of Endocrinology**, v.203, n.3, p.337-347, 2009.

ANEXO

- ANEXO A - Normas Específicas da CPG da FCF-USP**
- ANEXO B - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**
- ANEXO C Ficha do Aluno**
- ANEXO D - Curriculum Lattes**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/38/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Efeito da suplementação com leucina sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na via da mTOR em ratos destreinados submetidos a restrição calórica”** (Protocolo CEUA/FCF/311), de responsabilidade dos pesquisadores **João Alfredo Bolivar Pedroso e Luciana Sigueta Nishimura** sob a orientação da Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP