

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

**Suplementação crônica de leucina não impede a condição
pró-inflamatória do destreinamento físico.**

Emídio Marques de Matos-Neto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2011

Emídio Marques de Matos-Neto

**Suplementação crônica de leucina não impede a condição
pró-inflamatória do destreinamento físico.**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

Aqueles que sonham, criam asas.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio (*in memorian*) e Antonia. Tudo o que sou, é fruto do que vocês me ensinaram.

À minha querida irmã Leila, pelo carinho e pela crença inamovível no meu sucesso.

Aos meus avós, Emídio e Hilda (*in memorian*), pelo exemplo de união.

AGRADECIMENTOS

Caro leitor, o trabalho que você vai lê nas páginas seguintes é absolutamente formal como dever ser o relatório de um trabalho científico. Contudo, peço licença a você para ser informal aqui neste espaço.

Este é um momento absolutamente feliz da minha de vida e espero que você possa entender um pouquinho do tamanho desta felicidade lendo os próximos parágrafos.

Sou o décimo terceiro filho de uma bela família que entendeu desde sempre que a união nos tornaria fortes para enfrentarmos qualquer desafio que nos fosse apresentado. Entendemos que não há outro caminho para conquistarmos aquilo que desejamos senão o trabalho árduo e persistente. Por isso, o término deste ciclo da minha vida é uma conquista que quero compartilhar com cada um desta minha amada família.

Meu pai, um homem de uma inteligência inacreditável, percebeu muito cedo que apenas a educação seria capaz de livrar nordestinos nascidos pobres do destino (quase que divino!) a que estaríamos condenados por toda a vida. Por esta percepção, não poupou esforços para que pudéssemos frequentar a escola. Meu pai, como eu gostaria que o senhor estivesse aqui para lhe dar um abraço forte, olhar no seu olho e dizer: valeu a pena!

Minha mãe sempre soube, mesmo que inconscientemente, que o amor ensina mais do que qualquer castigo ou que a rigidez excessiva e foi capaz de se doar inteiramente por nós. Mamãe, não existe ensinamento melhor que uma mãe possa transmitir a um filho do que o exemplo diário de que o amor pode e deve ser generoso. Com a senhora aprendo diariamente que a generosidade, ao invés de dividir, multiplica. Minha mãe, cada dia da minha vida é dedicado à senhora...Simplesmente te amo!

Minha irmã Leila, nos tornamos “donos de casa” prematuramente e aprendemos, forçosamente, que sonhos até podem ser adiados, mas nunca renunciados. Se hoje posso dar passos maiores, tenho que agradecer a sua coragem para enfrentar as adversidades e seguir em frente sem pestanejar. Este título é seu também. Muitíssimo obrigado. Eu te amo!

Maninha Dalina, maninha Socorro e meus irmãos Tico, Zé Doninha, Zezinho, Miguel, Manoel, João, Tota, Luís, Adão, Maria Helena e Adriana, suas histórias de vida são, para

mim, um estímulo diário para seguir em frente. A vocês, às minhas cunhadas e aos meus incontáveis sobrinhos e sobrinhas, muito obrigado.

Queridos tios, tias, primos e primas, é confortante saber que posso contar com o carinho e apoio de vocês. Obrigado!

Meu amigo-irmão-preto Léo, certamente não conseguirei escrever aqui a importância da sua amizade, orientação acadêmica e de vida, mas tentarei expressar pelo menos um pouco do que você representa na minha vida. Você é um dos grandes responsáveis por essa etapa de vida que se conclui agora; você me incentivou quase que diariamente para que eu largasse uma carreira relativamente bem-sucedida como treinador personalizado e continuasse minha vida acadêmica. Vim para São Paulo com uma única certeza, que teria um amigo me esperando. Errei. Não encontrei um amigo, na verdade, encontrei um irmão-companheiro que me ensinou e ensina diariamente que a vida, às vezes, pode ser dura, os dias podem ser curtos, mas sempre haverá espaço para uma boa gargalhada. Não bastasse tudo isso, você ainda me apresentou a essa tal de “leucina”, me ajudou a pensar o projeto, levou várias mordidas de rato, me ajuda a pensar nos resultados...ENFIM, obrigado por tudo!

Meus amigos-irmãos Rodrigo e Aureliano obrigado pela amizade sincera e que só cresce a cada dia, independente da distância, eu os amo muito. Minhas amigas Marlane, Mooooooura, Érica, Thaline, Aninha, Waldênia, Leny, Dirciana e Márcia, obrigado pelo carinho! Meus amigos Eduardo, Daniel, Paulo Ricardo, Paulo Lula, Túlio, Nelson, Vicente, Mauro, Marcos, Francinélío e Eugênio, agradeço a vocês pela convivência e pelo aprendizado de tantos anos.

Meu amigo Tupy, você faz parte dessa caminhada. Muitíssimo obrigado por todos os ensinamentos! Minha amiga Graça Cordeiro, obrigado pela lição de vida que é a sua própria vida!

Minha amiga Dilina, obrigado pelo apoio, pelo carinho e pela amizade. Sua dedicação e sucesso são um exemplo a ser seguido. Ah! Concordo plenamente com o meu orientador, seu sorriso é lindo demais da conta (rsrsrsrsrsrs).

Minha amiga Lulu, você é uma menina linda que aprendi admirar e respeitar. Muito obrigado.

Meus amigos Antonio, Lilian e Milessita, adoro a amizade de vocês, os vinhos bebidos e os que ainda beberemos, a boa música.....”*hoje eu acordei com uma vontade danada de mandar flores ao delegado, de bater na porta do vizinho e desejar bom dia*”...Vocês são demais.

Minha família Piauí-sampa, Vivi, Lili, Ana Mara, Michele, George (ai, ai, delícia), Kaluce, obrigado pela amizade, pelo papo, pelos almoços nordestinos...Vocês são vencedores.

Meus amigos do laboratório, Taty, Mari Rezende, Mari Lindenberg, Vinicius, Dai, Ivanir, Lu Rossi, Andrea, Larinha, Bianca e Thaís, obrigado pela convivência, ajuda e ensinamentos compartilhados. Este trabalho não seria possível sem a ajuda de todos vocês.

Meu amigo-pretinho Lucas, você é várias coisas ao mesmo tempo. Às vezes você é meio doido, meio perdido, super-sincero, metido a macho, meigo...Enfim, você é um grande amigo e um exemplo de dedicação. Sua empolgação com a pesquisa é sempre um incentivo para tentar mais uma vez, repetir e repetir um ensaio até ficar bom. Obrigado por tudo!

Minha amiga Gabriela, você é a pessoa mais doce que já conheci. Adoro o seu jeito ingênuo de ser, sua linda voz...Você mora num pedacinho do meu coração. Obrigado por tantas risadas que demos juntos!

Michele, mãe dos meus filhos, foi muito bom compartilhar com você todo esse tempo de mestrado. Ao final, temos uma tese e uma dissertação, o que não é pouco. Certamente o trabalho foi menos cansativo com a sua ajuda, o seu companheirismo.....afinal, “parceiro é parceiro”. Obrigado por tudo!

Professor Julio, obrigado pela orientação e, mais do que isso, pelo ensinamento de vida, pelo respeito, pela oportunidade. Em quase três anos de convivência nunca o ouvi subir o tom de voz para conversar com quem quer que seja; o senhor sempre foi muito educado e soube respeitar as potencialidades e limites de cada um. Obrigado!

Marcelo, sua inteligência e sua capacidade de transmitir conhecimento me inspiram sempre. Marceletes, a convivência quase que diária com vocês me ensinou a respeitá-las e admirá-las. Dividimos conhecimentos, angústias e vitórias. Obrigado!

Miriam, você poderia ser apenas a amiga do Léo que contribuiu com o meu trabalho. Mas você é generosa demais e permitiu que pudéssemos ser amigos; admiro demais o seu jeito de ser. Assim como o Léo me apresentou a tal da “leucina”, você me apresentou este tal “papel biológico do tecido adiposo”. Obrigado pela imensa contribuição!

Ricardo, professora Primavera, Luciana e meninas do lab, obrigado pela disponibilidade e pelo apoio de vocês.

Elaine e Jorge, poderia elencar aqui as inúmeras qualidades profissionais de vocês, mas prefiro escrever sobre a amizade, o carinho, o respeito e a dedicação de vocês. Conviver com vocês é sempre um prazer e uma grande diversão; jogar boliche com o Jorge é a melhor coisa do mundo. Por quê? Temos certeza que não seremos os últimos colocados. E o cheiro no pescoço da Elaine!!! Um espetáculo!!! Obrigado por tudo!

Mônica, Edilson, Cléo e Essy, obrigado pela presteza e amizade durante todo esse tempo. Vocês tornam a nossa vida na pós-graduação bem mais simples. Meus sinceros agradecimentos. Lourdinha e Joanita, o dia a dia do B14 é, com certeza, bem melhor com a presença e o carinho de vocês. Muitíssimo obrigado.

Carlos, com você aprendo todo dia um pouquinho mais e quero aprender sempre; bastantão! Obrigado!

Aos professores da graduação, especialização e mestrado, agradeço a contribuição de cada um de vocês na minha formação.

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.

Obrigado, obrigado e obrigado por tudo. E que venha o futuro.

MATOS-NETO, E.M. **Suplementação crônica de leucina não impede a condição pró-inflamatória do destreinamento físico.** 2011. Dissertação de Mestrado [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil].

RESUMO

O treinamento físico (TF) é uma intervenção efetiva na redução do risco e/ou no tratamento de diversas doenças crônicas associadas com inflamação sistêmica de baixa intensidade. Entretanto, as alterações promovidas pelo TF na massa adiposa, nos parâmetros inflamatórios e na tolerância à glicose e à insulina podem ser rapidamente revertidas com o destreinamento físico. Por outro lado, estudos com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada, em especial, de leucina, demonstraram que essa intervenção nutricional pode ser efetiva na redução dos riscos de doenças que resultam em inflamação de baixa intensidade. Assim, objetivou-se, com este trabalho, investigar os efeitos da suplementação crônica de leucina na homeostase glicêmica e na expressão e fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no tecido adiposo periepididimal de ratos destreinados. Para tal, foram utilizados 46 ratos *wistar* machos com ~ 300 g de massa corporal distribuídos em dois grupos no Experimento I: Treinamento controle (T8, n = 8) e Sedentário controle (S8, n = 7); estes animais receberam a ração controle e o grupo T8 foi submetido ao TF por oito semanas. O Experimento II durou quatorze semanas, com oito de TF e seis de destreinamento físico. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: DT, grupo destreinado e com livre acesso à ração durante todo o experimento (n = 8); DTL, grupo destreinado e com livre acesso à ração controle durante o período de treinamento e à ração controle suplementada com 5 % de leucina no período de destreinamento físico (n = 7); T14, grupo que permaneceu treinando durante todo o período experimental e com livre acesso à ração controle (n = 8) e; S14, grupo que permaneceu sedentário durante todo o período experimental e com livre acesso à ração controle (n = 8). O TF por oito semanas foi efetivo em diminuir a adiposidade corporal, o volume de adipócitos e a concentração sérica de leptina, além de reduzir a fosforilação da proteína JNK2 no Experimento I. Inversamente, seis semanas de destreinamento físico foram suficientes para reverter estas alterações. Além disso, no Experimento II pudemos verificar uma redução nas concentrações de IL-6, IL-10 e na fosforilação de proteínas pró-inflamatórias no tecido adiposo periepididimal caracterizando, portanto, um quadro de inflamação crônica de baixa intensidade com o destreinamento físico. Verificamos ainda que o TF por quatorze semanas foi efetivo em aumentar a atividade máxima da enzima citrato sintase e que houve reversão deste parâmetro com o destreino. A suplementação de leucina foi capaz de manter o volume de adipócitos semelhante ao grupo que permaneceu treinando durante todo o experimento, mas não preservou a redução na concentração sérica de leptina. Os resultados evidenciam que o destreinamento físico promove aumento na adiposidade corporal com diminuição de adipocinas anti-inflamatórias e que a suplementação com leucina, nestas condições experimentais, não foi efetiva em preservar os efeitos do TF.

Palavras-chave: Treinamento físico, Destreinamento físico, Leucina, Tecido Adiposo.

MATOS-NETO, E.M. **Chronic leucine supplementation does not prevent the pro-inflammatory status of the physical detraining.** 2011. Master Dissertation [Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil].

ABSTRACT

Obesity is characterized as a chronic low-grade systemic inflammation and is associated with several non-transmissible chronic diseases. This metabolic disorder results from excessive food intake compared to energy expenditure, which leads to storage of excessive amount of triglycerides in the adipose tissue. Dietary intervention and exercise programs, promoting reduction in adiposity, have been identified as important strategies for reducing the risk and helping the treatment of obesity and associated diseases. However, changes promoted by physical training in fat mass, glucose tolerance and insulin sensitivity, as well as the activity of enzymes of energy metabolism can be rapidly reversed with detraining. Moreover, studies with branched-chain amino acid supplementation, particularly leucine, have demonstrated that nutritional intervention can be effective in reducing the risk of obesity and improving glycemic control. Therefore, the aim of this study is to investigate the effects of chronic leucine supplementation on glucose homeostasis and expression and phosphorylation of proteins involved in insulin signaling pathway in the epididymal adipose tissue of detrained rats. Male adult Wistar rats (approximately 300 g body weight) were used and divided into two groups for Experiment I: Control training [(T8, n = 8): control diet and 8-week physical training] and Control sedentary [(S8, n = 7): control diet for 8 weeks]. Experiment II comprised eight weeks of physical training and six weeks of detraining. The animals were divided into four groups: DT [detrained group with free access to standard diet throughout the experiment (n = 8)]; DTL [detrained group with free access to standard diet during the training period and to 5% leucine supplemented diet during the detraining period (n = 7)]; T14 [group under training throughout the experimental period with free access to standard diet (n = 8)] and; S14 [untrained group for the study period with free access to standard diet (n = 8)]. Physical training for eight weeks was effective in reducing body fat, adipocyte volume and serum leptin levels and in reducing the phosphorylation of JNK2 protein in Experiment I. Conversely, six weeks of detraining were sufficient to reverse these changes. Moreover, in Experiment II, a reduction in the concentrations of IL-6 and IL-10 was verified in the detrained animals, thus characterizing a condition of chronic low-grade inflammation with detraining. We also observed that training for fourteen weeks was effective in increasing the maximum activity of the enzyme citrate synthase; however, this effect was reversed with detraining. Leucine supplementation was able to sustain adipocyte volume similar to trained group (T14); however, it did not maintain the reduction in leptin levels. The results show that detraining promotes increased adiposity and reduces the levels of anti-inflammatory adipokines. Leucine supplementation, under the experimental conditions, was not effective in sustaining the effects of physical training.

Keywords: Physical training, Detraining, Leucine, Adipose Tissue.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Desenho experimental do experimento I | 33 |
| Figura 2. | Desenho experimental do experimento II..... | 34 |
| Figura 3. | Evolução semanal da massa corporal dos animais do experimento I..... | 51 |
| Figura 4. | Consumo médio semanal durante o experimento I..... | 52 |
| Figura 5. | Massa e composição química da carcaça referente ao experimento I..... | 54 |
| Figura 6. | Volume dos adipócitos do tecido adiposo EPI do experimento I..... | 54 |
| Figura 7. | Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose referente ao experimento I..... | 56 |
| Figura 8. | Concentração de ácidos graxos não esterificados referentes ao experimento I..... | 56 |
| Figura 9. | Expressão e fosforilação da Akt, no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I..... | 58 |
| Figura 10. | Expressão e fosforilação da IRS1 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I..... | 58 |
| Figura 11. | Expressão e fosforilação da JNK2, no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I..... | 59 |
| Figura 12. | Consumo médio das oito semanas iniciais do experimento II..... | 61 |
| Figura 13. | Consumo médio de ração durante todo o período do experimento II..... | 61 |
| Figura 14. | Massa e composição química da carcaça dos animais do experimento II..... | 64 |
| Figura 15. | Volume dos adipócitos do tecido adiposo EPI do experimento II..... | 65 |
| Figura 16. | Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose do experimento II..... | 66 |
| Figura 17. | Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose nos três momentos diferentes do experimento II..... | 67 |
| Figura 18. | Taxa de decaimento da glicose após administração de insulina (%. min ⁻¹) referente ao experimento II..... | 68 |
| Figura 19. | Atividade máxima da enzima citrato sintase referente ao | |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | experimento II..... | 69 |
| Figura 20. | Concentração sérica de IL-6 referente aos animais do experimento II | 70 |
| Figura 21. | Razão IL-10/TNF- α referente aos animais do experimento II..... | 71 |
| Figura 22. | Expressão e fosforilação da Akt no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 72 |
| Figura 23. | Expressão e fosforilação da IRS1 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 72 |
| Figura 24. | Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 73 |
| Figura 25. | Expressão e fosforilação da proteína quinase IKK no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 74 |
| Figura 26. | Expressão e fosforilação da proteína quinase PKC θ no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 74 |
| Figura 27. | Expressão e fosforilação da proteína quinase AMPK α no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II..... | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1. | Composição das rações..... | 32 |
| Tabela 2. | Massa corporal e variação da massa corporal referente ao experimento I..... | 50 |
| Tabela 3. | Consumo médio de ração e macronutrientes durante o período experimental dos grupos T8 e S8..... | 52 |
| Tabela 4. | Peso dos coxins adiposos SUB, EPI e RET e soma (Σ) de todos os depósitos referentes ao experimento I..... | 53 |
| Tabela 5. | Glicemia de jejum na semana 0 e na semana 8 referente ao experimento I..... | 55 |
| Tabela 6. | Concentrações séricas das citocinas adiponectina, leptina, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 referentes ao experimento I..... | 57 |
| Tabela 7. | Massa corporal inicial, nas semanas oito e quatorze do protocolo experimental e variação entre as semanas, referente ao grupo experimental II..... | 60 |
| Tabela 8. | Consumo médio de ração no período de destreinamento físico do experimento II..... | 62 |
| Tabela 9. | Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada referente ao experimento II..... | 63 |
| Tabela 10. | Massa dos coxins adiposos EPI e RET e soma (Σ) de todos os depósitos referentes ao experimento II..... | 63 |
| Tabela 11. | Glicemia de jejum nas semanas 0, 8 e 13 durante o experimento II..... | 65 |
| Tabela 12. | Concentração de ácidos graxos não esterificados referentes ao experimento II..... | 68 |
| Tabela 13. | Concentrações séricas de adiponectina, leptina, TNF- α , IL-1 β e IL-10 referentes ao experimento II..... | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| % G | Percentual de gordura |
| 4-AA | Aminoantipirina |
| 4EBP1 | Proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1 |
| Acetil-CoA | Acetil coenzima A |
| ACOD | Acil-CoA-Oxidase |
| ACR | Aminoácidos de cadeia ramificada |
| ACS | Acil-CoA Sintetase |
| AGNE | Ácidos graxos não esterificados |
| AIN-93M | <i>American Institute of Nutrition</i> – 1993 para ratos adultos |
| Akt | Proteína quinase B |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| AMPK | proteína quinase ativada por AMP |
| ATACR | Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CHO | Carboidrato |
| CS | Citrato sintase |
| DCCR | Desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada |
| DCNT | Doenças crônicas não transmissíveis |
| DT2 | Diabetes tipo 2 |
| DT | Destreinado |
| DTL | Destreinado leucina |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |

| | |
|--------------------------------|--|
| eIF4A | Fator de iniciação eucariótico 4A |
| eIF4E | Fator de iniciação eucariótico 4E |
| eIF4F | Fator de iniciação eucariótico 4F |
| eIF4G | Fator de iniciação eucariótico 4G |
| EPI | Tecido adiposo periepididimal |
| GLUT4 | Transportador de glicose 4 |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IKK | Quinase inibidora do I κ B |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-1ra | Antagonista de receptor de interleucina 1 |
| IL-1α | Interleucina 1 alfa |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IRS-1-2 | Substrato do receptor de insulina 1 e 2 |
| IRβ | Subunidade β do receptor de insulina |
| Isovaleril-CoA | Isovaleril coenzima A |
| IκB | Inibidor do NF- κ B |
| JNK | c-jun-N-terminal quinase |
| Kcal | Quilocalorias |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KIC | α -cetoisocaproato |
| Kitt | Constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática |

| | |
|-------------------------------|---|
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LEU | Leucina |
| LIP | Lipídios |
| MEHA | 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina |
| MLG | Massa corporal livre de gordura |
| mTOR | Alvo da Rapamicina em Mamíferos |
| N | Nitrogênio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| PBST | Solução salina tamponada com fosfato adicionada de <i>Tween</i> |
| PI3-K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PKCθ | Proteína quinase C <i>theta</i> |
| PPi | Ácido fosfórico |
| PTN | Proteína |
| RET | Tecido adiposo retroperitoneal |
| RNAm | Mensageiro do ácido ribonucleico |
| rpm | Rotações por minuto |
| S6 | Proteína ribossomal S6 |
| S6K1 | Quinase da proteína ribossomal S6 |
| S8 | Sedentário por oito semanas |
| SDS | <i>Sodium duodecyl sulfate</i> |
| T14 | Treinado por quatorze semanas |
| T8 | Treinado por oito semanas |
| TAB | Tecido adiposo branco |
| TEMED | Tetrametiletilenediamina |

| | |
|--------------------------------|--|
| TF | Treino físico |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TOTG | Teste oral de tolerância à glicose |
| TSC1/TSC2 | Complexo tuberina/hamartina |
| TTI_{ip} | Teste intraperitoneal de tolerância à insulina |
| U | Unidades de insulina |
| xMAP™ | <i>Multiple Analyte Profiling</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 28 |
| 3. OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 29 |
| 3.2.1 Experimento I..... | 29 |
| 3.2.2 Experimento II..... | 29 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 Condições experimentais..... | 30 |
| 4.1.1 Animais..... | 30 |
| 4.1.2 Rações..... | 30 |
| 4.2 Grupos Experimentais..... | 33 |
| 4.2.1 Experimento I..... | 33 |
| 4.2.2 Experimento II..... | 33 |
| 4.3 Manipulação dos animais, determinação da massa corporal e do consumo de ração..... | 35 |
| 4.3.1 Protocolo de treinamento..... | 35 |
| 4.3.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)..... | 37 |
| 4.3.3 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TTI_{ip})..... | 38 |
| 4.3.4 Eutanásia..... | 38 |
| 4.4 Análises..... | 39 |
| 4.4.1 Determinação da composição corporal..... | 39 |
| 4.4.1.1 Umidade da carcaça..... | 40 |
| 4.4.1.2 Lipídios..... | 40 |
| 4.4.1.3 Massa livre de gordura (MLG)..... | 41 |
| 4.5 Isolamento dos adipócitos e análise morfológica..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.6 Parâmetros séricos..... | 42 |
| 4.6.1 Ácidos graxos não esterificados (AGNE)..... | 42 |
| 4.6.2 Determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS)..... | 43 |
| 4.6.3 Citocinas..... | 43 |
| 4.7 Determinação da concentração de proteínas teciduais no tecido adiposo EPI e no músculo sóleo..... | 44 |
| 4.8 <i>Western Blotting</i> | 44 |
| 4.8.1 Extração de proteínas..... | 44 |
| 4.8.2 Preparo do gel de poliacrilamida..... | 45 |
| 4.8.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> .. | 46 |
| 4.8.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose).. | 46 |
| 4.8.5 Sondagens das proteínas com anticorpos..... | 46 |
| 4.8.6 Revelação com sistema quimioluminescente..... | 47 |
| 4.8.7 <i>Stripping</i> | 47 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 6. RESULTADOS..... | 50 |
| 6.1 Experimento I..... | 50 |
| 6.1.1 Evolução da massa corporal..... | 50 |
| 6.1.2 Consumo de ração..... | 51 |
| 6.1.3 Massa dos coxins adiposos e composição corporal..... | 52 |
| 6.1.4 Volume de adipócitos do tecido EPI..... | 54 |
| 6.1.4 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose..... | 55 |
| 6.1.5 Ácidos graxos não esterificados..... | 56 |
| 6.1.6 Concentrações séricas de citocinas..... | 57 |
| 6.1.7 Expressão proteica no tecido adiposo EPI..... | 57 |
| 6.1.7.1 Expressão e fosforilação da proteína quinase Akt..... | 57 |
| 6.1.7.2 Expressão da proteína quinase IRS1..... | 58 |
| 6.1.7.3 Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2 Experimento II..... | 59 |
| 6.2.1 Evolução da massa corporal..... | 59 |
| 6.2.2 Aminograma e consumo da ração..... | 60 |
| 6.2.3 Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada..... | 62 |
| 6.2.4 Massa dos coxins adiposos e composição corporal..... | 63 |
| 6.2.5 Volume de adipócitos do tecido adiposo EPI..... | 64 |
| 6.2.6 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG)..... | 65 |
| 6.2.7 Teste de tolerância à insulina (TTIip)..... | 68 |
| 6.2.8 Ácidos graxos não esterificados..... | 68 |
| 6.2.9 Atividade máxima da enzima citrato sintase..... | 69 |
| 6.2.10 Concentrações séricas de citocinas..... | 69 |
| 6.2.11 Expressão proteica no tecido adiposo EPI..... | 71 |
| 6.2.11.1 Expressão e fosforilação da proteína quinase Akt..... | 71 |
| 6.2.11.2 Expressão da proteína quinase IRS1..... | 72 |
| 6.2.11.3 Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2..... | 73 |
| 6.2.11.4 Expressão e fosforilação da proteína quinase IKK | 73 |
| 6.2.11.5 Expressão e fosforilação da proteína quinase PKCθ | 74 |
| 6.2.11.6 Expressão e fosforilação da proteína quinase AMPKα | 75 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 76 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 89 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 90 |
| ANEXOS | |

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico (TF) é uma intervenção efetiva na redução do risco e/ou no tratamento de diversas doenças crônicas associadas com inflamação sistêmica e de baixa intensidade. Esta efetividade acontece, pelo menos em parte, pelo efeito anti-inflamatório exercido pelo TF. Neste sentido, os estudos evidenciam que este efeito pode ser mediado via redução da gordura corporal, especialmente visceral, com subsequente diminuição da liberação de adipocinas pró-inflamatórias e aumento da síntese e liberação das adipocinas anti-inflamatórias tanto do tecido adiposo branco (TAB) quanto a partir da contração do músculo esquelético (denominadas miocinas). Contudo, até o presente momento não é possível determinar qual a importância exata de cada um dos mecanismos anti-inflamatórios envolvidos, embora seja provável que haja uma relação de dependência com o modo, a frequência, a intensidade e a duração do exercício físico realizado (Gleeson *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm destacado a influência do TF no metabolismo do TAB (STALLKNECHT, 2004; PERES *et al.*, 2005; GOLLISCH *et al.*, 2009). Estudos transversais e longitudinais demonstram que essa estratégia é capaz de reduzir a massa adiposa em humanos (BERMAN *et al.*, 1999; KOPELMAN, 2000; KEITH *et al.*, 2006), além de aumentar a sensibilidade à insulina nesse tecido (PASMANN *et al.*, 1999; LUZ *et al.*, 2011). Adicionalmente, avaliações em ratos indicam o efeito potencial do TF na redução do TAB nos mais diferentes coxins adiposos atenuando fatores de risco metabólico (PERES *et al.*, 2005; GOLLISCH *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2009).

Os estudos científicos reportam que biomarcadores de inflamação, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , a interleucina (IL)1 α e a IL-1 β , são reduzidos após longos períodos de mudanças comportamentais que envolvem tanto diminuição do consumo energético quanto aumento dos níveis de atividade física (PETERSEN & PEDERSEN, 2005). Embora os efeitos agudo e crônico do exercício físico sobre a regulação do peso corporal ainda sejam controversos, muitos indivíduos que conseguem manter a perda de peso por mais de dois anos costumam relatar níveis elevados de atividade física (PATTERSON & LEVIN, 2008), sugerindo que o exercício físico pode impedir a diminuição da taxa metabólica de repouso que, frequentemente, ocorre com a perda de peso. Portanto, o aumento do gasto energético total promovido pela atividade física é importante componente de muitas intervenções no estilo de vida para reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis (MANTHOU *et al.*, 2010).

1. Introdução

A adesão a um programa de exercício físico pode proporcionar muitas melhorias metabólicas e hormonais em diferentes tecidos (PERES *et al.*, 2005, LUZ *et al.*, 2011). O tecido muscular esquelético e o TAB são responsivos à ação da insulina, condição esta que pode ser influenciada por meio da redução dos depósitos de gordura visceral e subcutâneo (VIEIRA *et al.*, 2009). O aumento da captação de glicose verificado após o TF é, parcialmente, devido à maior atividade e expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, bem como devido ao aumento do conteúdo e da translocação do transportador de glicose (GLUT)-4 no tecido muscular esquelético (FROSIG *et al.*, 2007; TORRES-LEAL *et al.*, 2010) e no TAB (HIRSHMAN *et al.*, 1989; HIRSHMAN *et al.*, 1993; STALLKNECHT *et al.*, 1993; FERRARA *et al.*, 1998). Associado a esta maior eficiência da ação da insulina, encontra-se também o aumento na atividade de enzimas lipogênicas, como, por exemplo, a lipase de lipoproteína muscular, após o TF (LAMBERT *et al.*, 1994; PERES *et al.*, 2005).

Atualmente, é conhecido que diversas citocinas pró-inflamatórias produzidas e secretadas pelos adipócitos podem causar resistência à ação da insulina e alterações na sua secreção. Dentre estas citocinas, o TNF- α correlaciona-se negativamente com o metabolismo da glicose (WARNE, 2003). Além disso, o TNF- α está envolvido na ativação de vias de sinalização intracelulares que culminam no aumento da resposta inflamatória. Neste sentido, destaca-se a ativação de uma proteína presente na via das MAPK, designada c-jun-N-terminal quinase (JNK) (HIROSUMI *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 2006; VALLERIE & HOTAMISLIGIL, 2010), a qual diminui a ativação da via de sinalização da insulina por mecanismos que reduzem a fosforilação em tirosina do receptor de insulina e dos seus substratos (IRS-1 e IRS-2), controlando negativamente a propagação de seu sinal intracelular (HIROSUMI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003; VALLERIE, & HOTAMISLIGIL, 2010).

O TNF- α e a IL-1 β também podem ativar outra via pró-inflamatória, IKK/I κ B/NF- κ B (GAO *et al.*, 2002; DEMPSEY *et al.*, 2003). Nesta via, IKK β , JNK e proteína quinase C (PKC) podem fosforilar em serina o IRS-1, comprometendo a transdução do sinal da insulina (SHOELSON *et al.*, 2003). Desse modo, condições que favoreçam a secreção dessas citocinas e posterior ativação das proteínas que compõem essas vias de sinalização podem desencadear fatores que estimulam uma condição pró-inflamatória e, conseqüentemente, disfunções metabólicas que contribuam significativamente para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina e, posteriormente, diabetes do tipo 2 (DT2) (GAO *et al.*, 2002).

1. Introdução

Outra via que merece especial atenção é a fosfatidilinositol 3-quinase/Proteína quinase B (PI3-K/Akt), que é importante na regulação da mitogênese, da diferenciação celular e do transporte de glicose estimulado pela insulina (MANNIG *et al.*, 2007). 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, os estudos têm focado sua atenção na PI3-K, uma vez que esta proteína está envolvida diretamente no transporte de glicose (PERES *et al.*, 2005). Em indivíduos jovens, o TF aumentou a atividade da PI3-K, por alterar mecanismos pós-receptores da insulina, melhorando assim a capacidade de captação de glicose (KIRWAN *et al.*, 2000). No entanto, em indivíduos diabéticos, estes resultados ainda são contraditórios, uma vez que uma única sessão de exercício físico de intensidade moderada aumentou a fosforilação em resíduos de tirosina presentes no receptor de insulina e no IRS-1 sem melhorar a captação de glicose estimulada por este hormônio (CUSI *et al.*, 2000).

Petersen e Pedersen (2005) evidenciaram que o aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10, com a prática de exercício físico, está relacionado com a liberação de IL-6, a partir da fibra muscular. Esta citocina, por sua vez, além de induzir a lipólise, a oxidação de ácidos graxos e estar envolvida na homeostase glicêmica durante o exercício, ainda estimula a síntese de IL-1ra, TNF-R e IL-10, que inibem a síntese de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , que têm ação pró-inflamatória. O aumento da concentração plasmática de IL-6 após exercício físico está relacionado à sua intensidade e duração, além da massa muscular recrutada e da capacidade de *endurance* do praticante. Adicionalmente, os estudos indicam que a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é regulada por aumentos nas concentrações de IL-6 liberada a partir da fibra muscular em contração que acarreta em aumento da oxidação de ácidos graxos (RUDERMAN *et al.*, 2006).

Desse modo, diversas evidências na literatura apontam para os efeitos benéficos do TF, aumentando o perfil de secreção de citocinas anti-inflamatórias. Lira *et al.* (2008) reportaram que 8 semanas de TF a 55-65 % do VO₂ máximo aumentaram a concentração de IL-10 no tecido adiposo mesentérico, elevando, desta forma, a razão IL-10/TNF α em ratos. Por outro lado, Gill *et al.* (2003), estudando atletas de *endurance*, encontraram concentrações plasmáticas 35 % mais elevadas de TNF α no grupo destreinado, quando comparado ao grupo treinado, sugerindo que a capacidade anti-inflamatória do exercício regular diminui rapidamente com o destreinamento físico (cessação do TF).

1. Introdução

O destreino físico promove rápido aumento da massa adiposa, ganho de massa corporal e resistência à insulina, tanto em humanos quanto em animais (PETIBOIS *et al.*, 2004; KUMP & BOOTH, 2005; YASARI *et al.*, 2006; YASARI *et al.*, 2007). Estudos em atletas de *endurance* altamente treinados mostraram que 7 a 10 dias de destreino físico reduziram significativamente a tolerância à glicose (ARCIERO, SMITH & CALLES-ESCANDON, 1998). O desenvolvimento da hiperinsulinemia pelo destreino físico poderia ser causado pelo aumento da adiposidade (LEE *et al.*, 2004), tendo sido sugerido que a maior deposição de gordura nos adipócitos interfere nos mecanismos de ação da insulina (BIRNBAUM, 2001; LEWIS *et al.*, 2002).

A interrupção do TF é acompanhada do aumento do quociente respiratório, em exercícios submáximos e máximos (MARLES *et al.*, 2007), indicando maior participação dos carboidratos no fornecimento de energia em detrimento do metabolismo dos lipídios (MUJIKÁ & PADILLA, 2000). A sensibilidade à insulina em resposta a um teste oral de tolerância à glicose diminui rapidamente com a inatividade (ARCIERO, SMITH & CALLES-ESCANDON, 1998; KUMP & BOOTH, 2005), fato que pode estar associado à redução da quantidade de GLUT4 (HOST *et al.*, 1998). Por outro lado, o destreino induz rápida diminuição da atividade da enzima lipase de lipoproteína presente no tecido muscular, aumento da lipemia pós-prandial, diminuição da concentração plasmática de HDL e aumento da concentração plasmática de LDL (YASARI *et al.*, 2007).

Estudos sobre o destreino físico em atletas têm demonstrado que a cessação do TF promove mudanças na sensibilidade à insulina, nos lipídios plasmáticos e na composição corporal que se assemelham aos distúrbios que ocorrem na síndrome metabólica. A interrupção do TF com duração de 10 a 30 dias é associada com diminuição da sensibilidade à insulina, tanto em corredores *masters* de elite quanto em jovens canoístas (ROGERS, 1990; LIU *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2006) mostraram que, após 2 meses de interrupção do treinamento, dançarinas apresentaram aumento da circunferência da cintura e da concentração plasmática de insulina em um teste de tolerância oral à glicose, apesar de não encontrarem mudanças significativas na massa corporal. Além disso, uma semana de destreino físico foi relacionada a aumento significativo na concentração plasmática de triacilgliceróis, tanto em jejum quanto no estado pós-prandial (GILL *et al.*, 2003).

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

1. Introdução

fosforilação da Akt e da concentração de GLUT-4 após estímulo com insulina em músculo esquelético. Além disso, promove redução da subunidade β do receptor de insulina (IR β) e da sua fosforilação (KUMP & BOOTH, 2005). Essas evidências demonstram que alterações intracelulares estão associadas com redução da sensibilidade à insulina com o destreino físico.

Evidências científicas indicam que o rápido aumento de massa adiposa com o destreino físico constitui um estímulo para o desenvolvimento da obesidade em humanos (SHEPARD *et al.*, 2001; PETIBOIS *et al.*, 2004), sugerindo que esta condição representa um estado de pré-obesidade (YASARI *et al.*, 2007). Foi demonstrado que a interrupção repentina do TF promove descontrole na ingestão alimentar, por mecanismos ainda pouco esclarecidos, podendo resultar em acúmulo de triacilgliceróis nos adipócitos (APPLEGATE, UPTON & STERN, 1984; LAMBERT *et al.*, 1994; MUELLER, HERMAN & EIKELBOOM, 1999). Desse modo, torna-se necessário identificar as consequências fisiológicas, assim como os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da massa de tecido adiposo e no desenvolvimento da obesidade associada ao destreino físico.

Nos últimos anos, com o conhecimento da capacidade do TAB em secretar citocinas (conhecidas como adipocinas), grande importância foi atribuída ao seu papel endócrino. Estas adipocinas transformaram os conceitos sobre a função biológica do TAB, firmando o entendimento desse tecido não apenas como um fornecedor e armazenador de energia, mas como um órgão dinâmico e central da regulação metabólica (FONSECA-ALANIZ, 2007). Sabe-se, ainda, que o tecido adiposo está submetido a contínuo processo de remodelação, que normalmente mantém a funcionalidade do tecido, mas, em condições adversas, este remodelamento pode levar a distúrbios metabólicos, como a resistência à insulina (LEE, WU & FRIED, 2010). Inicialmente, a ideia de que o tecido adiposo possa ter um efeito considerável sobre o controle glicêmico global não foi facilmente aceita. Os primeiros estudos determinaram que o tecido adiposo representa apenas pequena fração na captação de glicose após uma refeição (cerca de 10 a 15 %), com o restante da captação sendo realizada pelo músculo esquelético (KAHN, 1996). Entretanto, ficou igualmente claro que alterações na adiposidade têm profundas implicações na homeostase da glicose, ou seja, a obesidade e a lipodistrofia estão associadas à resistência à insulina e à hiperglicemia (ROSEN & SPIEGELMAN, 2006).

Considerando que o destreino físico está associado a várias alterações moleculares que favorecem o ganho de massa corporal, o acréscimo de tecido adiposo e a

1. Introdução

resistência à insulina, evidências científicas sugerem que medidas preventivas devam ser adotadas desde o início do período de destreinamento físico, como alimentação adequada e conservação de um estilo de vida minimamente ativo com manutenção parcial do exercício físico (MUJIKÁ & PADILLA, 2000; SHEPARD *et al.*, 2001; PADDON-JONES, 2006; YASARY *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008). Neste contexto, a adoção de estratégias alimentares, dentre elas, o uso de suplementos alimentares, que possam atuar na perda ou na manutenção de peso corporal, pode ser uma estratégia eficiente para retardar essas alterações metabólicas no período de destreinamento físico.

Nos últimos anos, estudos têm destacado a eficácia de dietas com maior percentual de proteína, em relação ao valor calórico total da dieta, na promoção de perda de peso, na maior redução de gordura corporal e na diminuição da perda de massa magra durante o emagrecimento, quando comparadas a dietas com menor teor proteico e isocalóricas (SKOV *et al.*, 1999; LAYMAN *et al.*, 2003; 2006; ZHANG *et al.*, 2007; LARSEN *et al.*, 2010). Sendo assim, a modulação na proporção de macronutrientes para perda de peso vem ganhando destaque ao longo dos anos, o que pode caracterizá-los como ferramenta útil para a redução dos riscos associados com a obesidade. Desse modo, alguns estudos, que avaliaram animais e humanos, demonstraram que o aumento do consumo de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), principalmente da leucina (LEU), promove maior perda de massa e de gordura corporais (SKOV *et al.*, 1999; LAYMAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007).

O papel do tecido adiposo no metabolismo de proteínas e aminoácidos é pouco conhecido. Contudo, evidências *in vitro* e *ex vivo* indicam que este tecido é capaz de metabolizar quantidades significativas de ACR (ROSENTHAL, ANGEL & FARKAS, 1974; TISCHLER & GOLDBERG, 1980). Rosenthal *et al.* (1974), baseados em medidas *ex vivo* do fluxo de leucina em tecidos de ratos, estimam que o tecido adiposo é o segundo tecido em capacidade de catabolizar ACR, depois do músculo esquelético, e que estes dois tecidos superam em 6 a 7 vezes o fígado, considerando as massas relativas dos diferentes tecidos. Recentemente, Herman *et al.* (2010) demonstraram a capacidade do tecido adiposo em catabolizar ACR circulantes *in vivo* e de regular a atividade das enzimas envolvidas no catabolismo destes aminoácidos.

Nessa perspectiva, foi observado que a leucina também é capaz de alterar o papel endócrino do tecido adiposo, estimulando a secreção de leptina e adiponectina (ROH *et al.*, 2003; LYNCH *et al.*, 2006; SUN & ZEMEL, 2007). Além disso, é importante destacar que a maioria das estratégias para perda de peso está associada à restrição energética, que, por

1. Introdução

sua vez, pode comprometer o estado nutricional proteico, favorecendo a perda de massa muscular (FARNSWORTH *et al.*, 2003). Assim, a fim de evitar perda de massa muscular, a utilização de LEU tem sido recomendada (DEVKOTA & LAYMAN, 2010), com base em seus efeitos anabólicos. Os primeiros estudos *in vitro* já apontavam a leucina como o principal regulador do metabolismo proteico muscular, por estimular a síntese e por inibir a degradação de proteínas (BUSE & REID, 1975; FULKS *et al.*, 1975; TISCHLER *et al.*, 1982).

Dentre os três ACR, a leucina apresenta maior taxa de oxidação quando comparada à isoleucina e à valina. As enzimas relacionadas ao catabolismo da leucina são as aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR) mitocondrial e citosólica e o complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR). A partir da reação reversível catalisada pela ATACR, o aminoácido é transaminado e convertido em seu respectivo cetoácido, o α -cetoisocaproato (KIC). Paralelamente, observa-se que, na reação catalisada pela ATACR, há a conversão de α -cetoglutarato – aceptor de nitrogênio oriundo dos ACR – em glutamato, o qual pode promover a síntese de outros aminoácidos, como alanina e glutamina. Posteriormente à reação catalisada pela enzima ATACR e à consequente formação do cetoácido, este pode sofrer descarboxilação oxidativa, uma reação irreversível, intermediada pelo complexo enzimático DCCR – presente na superfície interna da membrana mitocondrial. Mediante esta reação, o cetoácido KIC é convertido em isovaleril-CoA, que sofre oxidação por meio de duas diferentes desidrogenases, formando, em última instância, acetil-CoA e acetoacetato (VIANNA *et al.*, 2010).

A LEU atua de forma eficiente no balanço proteico muscular, bem como favorece a redução da gordura corporal, o que promove significativas alterações na composição corporal (DONATO *et al.*, 2006). Aliado a esses fatos, a LEU provoca a ativação da proteína quinase conhecida como Alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR), que, por sua vez, promove a ativação do processo de iniciação da tradução do mRNA (ANTHONY *et al.*, 2002; LYNCH *et al.*, 2002; KIMBALL & JEFFERSON, 2006).

A mTOR fosforila a proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa (S6K1), provocando sua ativação, a qual, por sua vez, fosforila e ativa a proteína ribossomal S6, que então modula a síntese de proteínas ribossomais e de fatores de alongação. Em última instância, a LEU estimula a síntese de complexos que são responsáveis pelo processo de iniciação da tradução de proteínas. A mTOR também fosforila a proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1 (4EBP1). A fosforilação dessa proteína reduz sua ligação com o fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E). Desta forma, o eIF4E livre pode se ligar a outros fatores de

1. Introdução

iniciação (eIF4G e 4A), formando o complexo eIF4F que, enfim, age na iniciação do processo de tradução proteica (ANTHONY *et al.*, 2002; MEIJER, 2003).

No tecido adiposo, a via de sinalização do mTOR atua em proteínas específicas envolvidas na diferenciação de pré-adipócitos, morfogênese do tecido adiposo, hipertrofia e secreção de leptina (LYNCH *et al.*, 2002). Além disso, a 4EBP1, um dos substratos mencionados acima, parece ser um novo regulador da adipogênese e da homeostase energética em mamíferos (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 2001).

Embora compreendidas inicialmente como duas vias distintas, mostrou-se que a PI3-K e a via de sinalização da mTOR estão conectadas por meio da quinase Akt/PKB. A via PI3K/mTOR é ativada por uma série de estímulos de diferentes receptores específicos, incluindo receptor de citocinas, receptor de insulina e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (WEICHHART *et al.*, 2008). Pauli *et al.* (2007) observaram que os efeitos negativos da dieta hiperlipídica sob a via IRS/PI3K/Akt foram mais acentuados no músculo de animais destreinados por 8 semanas.

No estudo de Walker *et al.* (1998), *in vitro*, foi demonstrado que aminoácidos em combinação com a insulina podem ativar a Akt independentemente da PI3K. Nessa perspectiva, pode-se destacar esta via como uma “via silenciosa” em situações normais, podendo ter papel importante na resistência à insulina. Dessa maneira, acredita-se que esta cascata de sinalização esteja envolvida na rota clássica da PI3K, permitindo a ativação da Akt/PKB e restaurando o transporte de glicose pela insulina.

Os mecanismos exatos pelos quais determinados aminoácidos e insulina ativam Akt ainda não foram totalmente elucidados. Uma hipótese poderia ser que o efeito exercido pelos aminoácidos parece ser específico no tecido adiposo. Outros tipos de células têm sido testados — incluindo adipócitos 3T3-L1, hepatócitos de ratos e tecido muscular — na restauração da via Akt/mTOR na presença de insulina e de leucina, quando a PI3-K é inibida; entretanto, só foram encontrados estes efeitos em adipócitos isolados de ratos e em explantes do tecido adiposo (HINAULT *et al.*, 2006).

Adicionalmente, Weichhart *et al.* (2008) evidenciaram que o pré-tratamento com rapamicina – inibidor da mTOR –, em células do sistema imune, aumentou significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . Neste sentido, existem evidências sugerindo que a capacidade da rapamicina em afetar a produção de citocinas pró e anti-

1. Introdução

inflamatórias envolve a via da mTOR. Esta interação ocorreria via complexo esclerose tuberosa 1-2 (TSC1-TSC2), o qual, por sua vez, regula negativamente a mTOR (INOKI *et al.*,2002).

2. JUSTIFICATIVA

Os benefícios metabólicos promovidos pelo TF sobre a redução da massa gorda e o aumento da sensibilidade à insulina são conhecidos, porém, os efeitos do destreinamento físico sobre tais fatores em indivíduos praticantes de atividade física, bem como em atletas, têm recebido pouca atenção. Atletas frequentemente cessam seus treinamentos por diversas razões, como lesões e férias; contudo, essa interrupção no período de treinamento pode representar forte perturbação na homeostase metabólica. Estudos anteriores evidenciaram alterações encontradas durante o período de destreinamento físico, as quais atuam como estímulo progressivo no ganho de gordura corporal, que pode acarretar em um estado de pré-obesidade (SHEPARD *et al.*, 2001; PETIBOIS *et al.*, 2004; YASARI *et al.*, 2007). Por sua vez, o aumento de gordura corporal – que favorece a ocorrência de um quadro de resistência periférica à ação da insulina e de inflamação crônica e de baixa intensidade – aumenta o risco do surgimento de DCNT, como DT2, cardiomiopatias, hipertensão arterial sistêmica, acidentes vasculares cerebrais e determinados tipos de câncer (OPAS, 2003). Paralelamente, existe também forte associação entre sedentarismo e resistência à insulina, a qual pode desencadear o surgimento de vários componentes da síndrome metabólica (BOOTH *et al.*, 2002).

Estudos com suplementação de ACR, em especial, com LEU, demonstraram que essa intervenção nutricional pode ser efetiva na redução do risco de obesidade, no controle glicêmico e do perfil lipídico e na manutenção do estado nutricional proteico (LAYMAN, 2003; DONATO *et al.*, 2006 e 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Todavia, até o momento, os mecanismos moleculares envolvidos nesta regulação exercida pela leucina não foram totalmente elucidados.

Nesse contexto, uma vez que o destreinamento físico está relacionado com diversas alterações metabólicas, que podem favorecer o surgimento de inúmeras doenças, aventa-se a hipótese de que a suplementação de LEU possa atuar como efetiva intervenção nutricional para retardar tais alterações. Nesse sentido, torna-se relevante o estudo dos efeitos da suplementação de LEU sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no TAB, em um protocolo experimental que envolva suplementação deste aminoácido e destreinamento físico. Tal estudo permitiria elucidar os possíveis mecanismos moleculares de ação da leucina em vias de sinalização diretamente relacionadas na etiologia de diferentes DCNT.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo investigou os efeitos da suplementação crônica de leucina na homeostase glicêmica e na expressão e fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no tecido adiposo periepididimal de ratos destreinados.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Experimento I

- Avaliar os efeitos do TF sobre:
 - ✓ A composição corporal e o consumo alimentar de ratos.
 - ✓ A homeostasia da glicose e as concentrações séricas de citocinas e ácidos graxos não esterificados.
 - ✓ A expressão e a fosforilação das proteínas IRS1, Akt e JNK no tecido adiposo periepididimal.

3.2.2 Experimento II

- Avaliar os efeitos do destreinamento físico associado à suplementação crônica de LEU sobre:
 - ✓ A composição corporal e o consumo alimentar de ratos.
 - ✓ Sobre a homeostasia da glicose e as concentrações séricas de citocinas e ácidos graxos não esterificados.
 - ✓ A expressão e a fosforilação das proteínas IRS1, Akt, JNK, PKC- θ , IKK- β e AMPK α no tecido adiposo periepididimal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições Experimentais

4.1.1 Animais

O presente estudo foi realizado com 46 ratos *Wistar* machos, adultos jovens e saudáveis, com oito semanas de idade e peso inicial médio de, aproximadamente, 300 g, fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos, dois a dois, durante 15 semanas, em caixa de polipropileno (dimensões de 30x18x13 cm), sob condições ambientais controladas, temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$, ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro (luz acesa às 2h00) e com 15 a 20 trocas de ar por hora durante 15 semanas. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com os princípios e procedimentos de cuidado com o uso de animais experimentais e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEA/FCF/65/2009), conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.2 Rações

As rações foram preparadas, em forma de *pellets*, nas dependências do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (REEVES, 1997), formuladas para manutenção de roedores.

Ração controle – mistura em pó, posteriormente peletizada. O conteúdo de macronutrientes na ração foi de 68,12 g de carboidrato/100 g de ração, 18,12 g de proteínas/100 g de ração e 4,00 g de lipídios/100 g de ração, representando 381,00 kcal/100 g de ração.

Objetivando manter o mesmo teor de nitrogênio em relação à ração suplementada de leucina, a ração AIN-93M foi ajustada, havendo o acréscimo de uma mistura de aminoácidos não essenciais, sendo eles: alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina. Acrescentamos essa mistura e não apenas um único aminoácido não essencial para

4. Material e Métodos

minimizarmos os possíveis efeitos metabólicos que pudessem gerar qualquer dúvida sobre o papel efetivo da suplementação de leucina.

Para o cálculo da dieta isonitrogenada, dividimos o peso molecular do nitrogênio pelo peso molecular da leucina e, assim, obtivemos o valor da quantidade de nitrogênio por grama de aminoácido (N/g de leucina). Em seguida, multiplicamos este resultado pela quantidade em gramas de leucina a ser suplementada por quilo de ração (50 g/kg) e, posteriormente, dividimos este resultado pelo número de aminoácidos não essenciais a serem adicionados à ração controle. Ao final, multiplicamos este novo resultado pelo peso molecular de cada aminoácido adicionado e dividimos pelo peso molecular do nitrogênio, resultando enfim, na quantidade em gramas de cada aminoácido a ser adicionado na ração controle.

A quantidade dos aminoácidos adicionados foi de 6,79 g de alanina, 10,15 g de ácido aspártico, 5,72 g de glicina, 8,78 g de prolina e 8,01 g de serina. Com o acréscimo de 39,45 g da mistura de aminoácidos, a mesma quantidade de amido foi retirada da ração para que o valor energético fosse mantido.

Ração suplementada de leucina – partindo da formulação da dieta AIN-93M, adicionamos 5 % de L-leucina (5 g/100 g), sendo que esta dose encontra-se dentro do maior nível de ingestão que não resultou qualquer efeito adverso (NOAEL = 5 g/100 g) (TSUBUKU *et al.*, 2004). Para isso, foram substituídos 50 g de amido por L-leucina purificada, para cada quilograma de ração preparada.

A ração suplementada de leucina foi preparada como uma mistura em pó e, posteriormente, peletizada. O conteúdo de macronutrientes na ração foi de 67,07 g de carboidrato/100 g de ração, 19,18 g de proteínas/100 g de ração e 4,00 g de lipídios/100 g de ração, representando 381,00 kcal/100 g de ração.

Os lotes de L-leucina, fornecidos pela empresa Ajinomoto® Interamericana Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil), apresentaram, respectivamente, graus de pureza de 100,4 % (98,5 % a 101,0 %) e 99,5 % (98,5 % a 101,0 %), segundo certificado de análise de cada lote. As rações oferecidas apresentaram as quantidades de minerais e vitaminas recomendadas para roedores (AIN-93M) (REEVES, 1997). A Tabela 1 detalha a composição dessas rações.

4. Material e Métodos

Tabela 1. Composição das rações.

| Ingredientes | Ração Controle (g/ kg de ração) | Ração Suplementada com 5 % de leucina (g/ kg de ração) |
|--|--|---|
| Amido | 581,242 | 570,692 |
| Sacarose | 100 | 100 |
| Caseína | 140 | 140 |
| Óleo de soja | 40 | 40 |
| Celulose | 50 | 50 |
| Mistura salina | 35 | 35 |
| Mistura vitamínica | 10 | 10 |
| L-Cistina | 1,8 | 1,8 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 |
| Tert-butil-hidroquinona | 0,008 | 0,008 |
| L-Leucina | ----- | 50 |
| Mix de aminoácidos¹ | 39,451 | ----- |
| Densidade energética (kcal/g) | 3,81 | 3,81 |
| <i>Distribuição dos Macronutrientes (%)</i> | | |
| Lipídios | 9,45 | 9,45 |
| Carboidrato | 71,52 | 70,41 |
| Proteína | 19,03 | 20,14 |

¹ Aminoácidos não essenciais (alanina, ácido aspártico, glicina, prolina, serina) – adicionados à ração controle para deixá-la isonitrogenada em relação à ração suplementada de leucina.

4.2 Grupos experimentais

4.2.1 Experimento I

Inicialmente, realizamos um experimento com duração de oito semanas para que pudéssemos caracterizar as adaptações ocorridas com o protocolo de TF em esteira ergométrica. Para tanto, distribuimos os animais em dois grupos: treinamento controle (T8, $n=8$) e sedentário controle (S8, $n=7$). Estes animais receberam a ração controle e o grupo T8 foi submetido ao protocolo de TF (**Quadro 1**). Após a oitava semana, todos os animais foram eutanasiados (**Figura 1**).

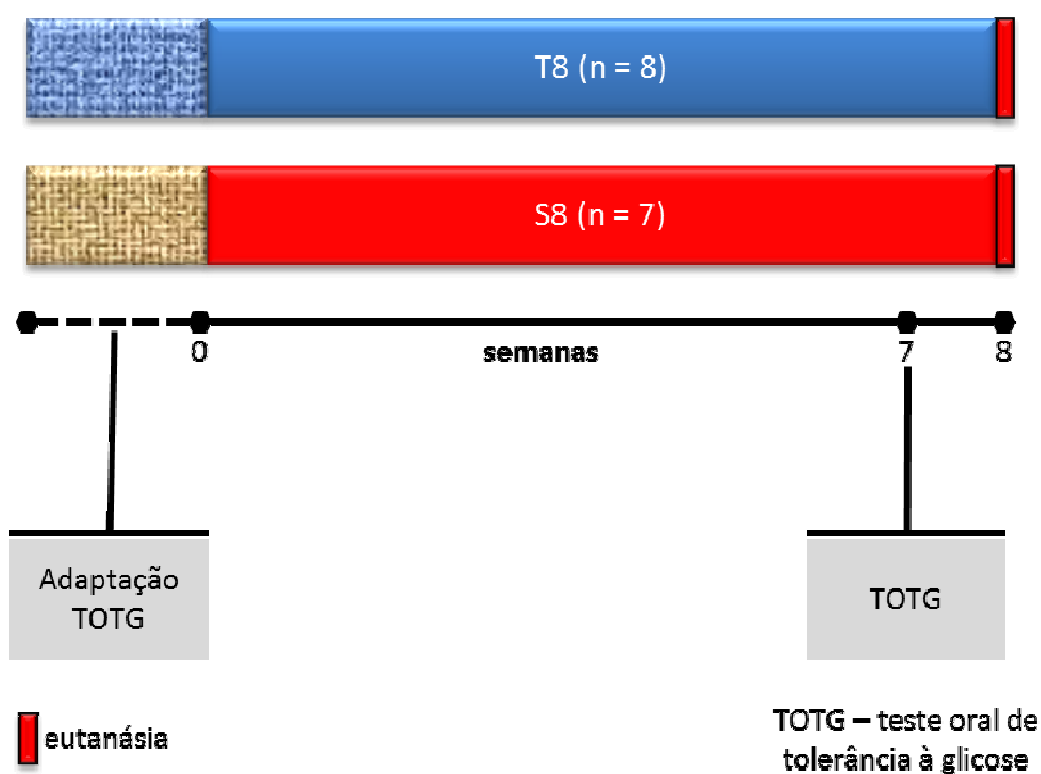


Figura 1. Desenho experimental do experimento I.

4.2.2 Experimento II

Após caracterização do TF, realizamos o segundo experimento, com duração de quatorze semanas, sendo oito semanas para o TF e seis semanas para o período de

4. Material e Métodos

destreino físico. Depois da oitava semana, redistribuímos os animais em quatro grupos pareados por idade, conforme descrito abaixo:

- DT:** grupo destreinado, por seis semanas, com livre acesso à ração AIN93-M durante todo o experimento ($n = 8$).
- DTL:** grupo destreinado, por seis semanas, com livre acesso à ração AIN93-M durante o período de treinamento e à ração AIN93-M suplementada com 5 % de leucina no período de destreino físico ($n = 7$).
- T14:** grupo que permaneceu treinando durante todo o período experimental e com livre acesso à ração AIN93-M ($n = 8$).
- S14:** grupo que permaneceu sedentário durante todo o período experimental e com livre acesso à ração AIN93-M ($n = 8$).

Após a décima quarta semana, todos os animais foram eutanasiados (**Figura 2**).

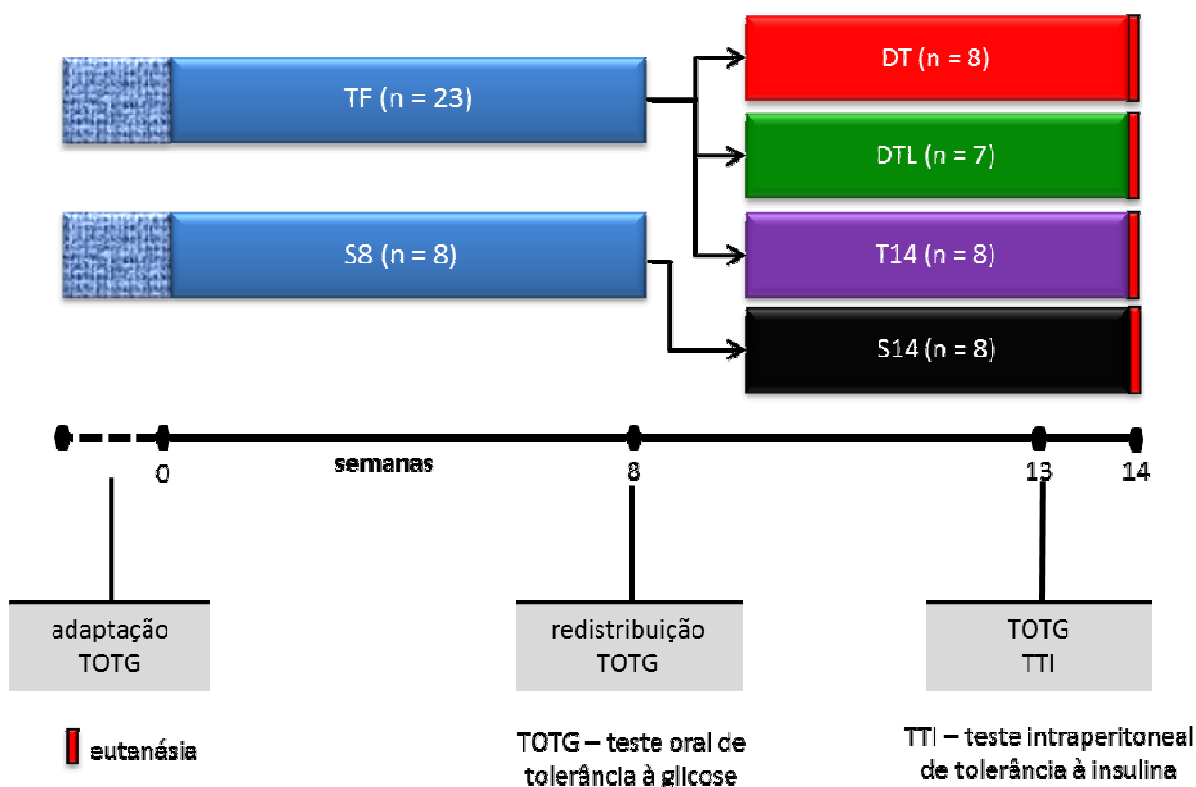


Figura 2. Desenho experimental do experimento II.

4.3 Manipulação dos animais, determinação da massa corporal e do consumo de ração

Os animais foram manipulados sempre no ciclo escuro da sala de experimentação e no período da manhã. O horário de manipulação representou, aproximadamente, a oitava hora do ciclo escuro.

O acompanhamento do peso corporal e do consumo de ração foi efetuado três vezes por semana, utilizando-se de balança semianalítica com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Para a avaliação do consumo de ração, foi calculada a diferença entre a quantidade de ração disponibilizada anteriormente e a sobra, considerando-se o montante desperdiçado. Toda a ração desperdiçada foi minuciosamente separada e pesada. A água dos bebedouros era esterilizada em autoclave, trocada duas vezes por semana e seu consumo era *ad libitum*.

4.3.1 Protocolo de treinamento

Os ratos do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de treinamento em esteira ergométrica programável (Softmove, Implemed, São Paulo, SP), que consiste de um programa de exercício de 1 hora/dia, 5 dias/semana, iniciando-se com tempos curtos e velocidades baixas que gradativamente aumentam até se atingir a intensidade preconizada (**Quadro 1**), adaptada para treinar 8 ratos simultaneamente, no ciclo escuro (permitindo que os animais pudessem realizar o TF em horário mais adequado ao padrão da espécie); enquanto os ratos realizavam a sessão de exercício físico, o grupo sedentário foi privado do acesso à ração e água para que as condições estressantes fossem iguais para todos os animais. Foi utilizado o protocolo de Negrão *et al.* (1992), adaptado por Dufloth & Michelini (1997); este protocolo preconiza uma semana de adaptação que permitiu a distribuição, por conveniência e por média de peso, dos grupos experimentais, uma vez que, alguns animais se mostram mais aptos que outros à realização do exercício físico. Segundo Borges-Silva *et al.* (2007), este protocolo foi eficiente no aumento do consumo máximo de oxigênio, da atividade máxima da enzima citrato sintase e de parâmetros do desempenho físico.

4. Material e Métodos

Quadro 1 – Protocolo de treinamento da adaptação até a semana 8.

| Semanas | Minutos/dia | Dias/semana | Velocidade Km/hora |
|------------------|-------------|-------------|--------------------|
| Adaptação | 15 | 5 | 0,5 |
| 1-2 | 30-40 | 5 | 0,6 |
| 3-4 | 60 | 5 | 0,7-0,8 |
| 5-6 | 60 | 5 | 0,9-1,0 |
| 7-8 | 60 | 5 | 1,0-1,2 |

Para os animais do grupo T14, o protocolo de treinamento foi adaptado para que houvesse incremento gradual da intensidade do exercício físico (**Quadro 2**).

Quadro 2 – Protocolo de treinamento da semana 9 até a semana 14.

| Dias | Minutos/dia | Velocidade Km/hora | Inclinação |
|------------------|-----------------|--------------------|------------|
| Semana 9 | | | |
| 1 | 30 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 30 min finais | 1,2 | |
| 2 | 35 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 25 min finais | 1,2 | |
| 3 | 40 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 20 min finais | 1,2 | |
| 4 e 5 | 45 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 15 min finais | 1,2 | |
| Semana 10 | | | |
| 1 | 50 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 10 min finais | 1,2 | |
| 2 | 55 min iniciais | 1,3 | 0% |
| | 5 min finais | 1,2 | |
| 3, 4 e 5 | 60 min | 1,3 | 0% |

| Semana 11 | | | |
|------------------|-----------------|-----|------|
| 1 a 5 | 15 min iniciais | 1,3 | 0,5% |
| | 45 min finais | | 0º |
| Semana 12 | | | |
| 1 a 5 | 20 min iniciais | 1,3 | 0,5% |
| | 40 min finais | | 0º |
| Semana 13 | | | |
| 1 a 5 | 25 min iniciais | 1,3 | 0,5% |
| | 35 min finais | | 0º |
| Semana 14 | | | |
| 1 a 4 | 30 min iniciais | 1,3 | 0,5% |
| | 30 min finais | | 0º |

4.3.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado na semana prévia (semana 0) ao início do protocolo experimental e ao término da sétima semana, para os animais do experimento I. Para os animais do experimento II, o teste foi realizado na semana que antecedia ao início do experimento (semana 0), na oitava e da décima terceira semanas do experimento. Após jejum de oito horas, uma amostra de sangue para determinação da glicemia de jejum foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), que na sequência recebeu, via gavagem, uma solução de dextrose (Atlética, SP, Brasil, pureza de 99,5%) na concentração de dois gramas de dextrose por quilograma de peso corporal (FREIRE *et al.*, 2008). 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®, SP, Brasil). Para garantirmos que o tempo de jejum entre os grupos experimentais fossem similares, realizamos o teste em rodízio entre os grupos, ou seja, o teste era feito com um animal de cada grupo até que se repetisse o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum.

4.3.3 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TTI_{ip})

Para a determinação da curva glicêmica após administração de insulina, foi injetada intraperitonealmente uma dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (Novolin[®] R, Novo Nordisk[®], Araucária, P. R., Brasil) nos animais em jejum de 4 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche[®], SP, Brasil) em amostras de sangue retiradas da veia caudal nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 min foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (Kitt), mediante análise da curva de decaimento, de acordo com o método proposto por Bonora *et al.* (1989). Este teste foi realizado na décima terceira semana do protocolo experimental. Mais uma vez, o procedimento foi realizado respeitando o rodízio entre os grupos experimentais para que o tempo médio de jejum fosse igual para todos.

4.3.4 Eutanásia

Com a finalidade de diminuir o intervalo de jejum entre os animais, no dia anterior à eutanásia, foi retirado o acesso à ração pelos animais por 4 horas; após esse período, os animais voltaram a ter acesso à ração por igual tempo de jejum numa 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 animais foram acondicionados em caixas limpas para garantir que não houvesse quaisquer resquícios de ração.

A ordem dos animais a serem 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 era eutanasiado até que se repetisse o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum.

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente 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. Quando constatado que o animal não apresentava mais reflexos, a cavidade abdominal foi aberta e foi retirada parte do tecido adiposo periepídidimo (EPI), que foi rapidamente pulverizado em nitrogênio líquido e armazenado em microtubo (capacidade de 1,5 mL).

4. Material e Métodos

Após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em um tubo *falcon* de 15 mL, sem anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos, separadas as respectivas porções séricas e devidamente armazenadas, em microtubos, em freezer (-80 °C).

Logo após a coleta de sangue, uma nova porção de 300 a 400 mg de EPI foi dissecada, coletada e rapidamente pulverizada em nitrogênio líquido e ali mantida em microtubos até o final da sessão de eutanásia, momento em que foi homogeneizada em tampão de extração de proteínas, para a quantificação da expressão e da fosforilação de proteínas de interesse pela técnica de *Western Blotting*.

O restante do coxim adiposo EPI, o coxim adiposo retroperitoneal (RET), os músculos gastrocnêmio e o sóleo de ambas as patas, além do fígado, foram cuidadosamente dissecados, pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus), colocados e embrulhados individualmente em lâminas de papel alumínio, previamente identificadas, e mantidos em nitrogênio líquido até o final da eutanásia.

Além disso, uma porção padronizada em 400 mg do EPI foi separada em frasco individual para análise do isolamento de adipócitos. As amostras de soro e de tecidos dos animais foram armazenadas em freezer a -80 °C.

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrointestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça. 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. Cabe ressaltar que, desde a decapitação até o congelamento dos tecidos transcorreram-se, no máximo, 5 minutos.

4.4 Análises

4.4.1 Determinação da composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada a partir da análise química da carcaça, para a determinação do conteúdo de lipídios e de umidade. A carcaça é constituída de todo o corpo do animal, com exceção da amostra de sangue, dos músculos gastrocnêmios e sóleos, do fígado, e dos coxins adiposos subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal, para os animais participantes do Experimento I, e da amostra de sangue,

4. Material e Métodos

dos músculos gastrocnêmios e sóleos, do fígado e dos tecidos adiposos brancos periepididimal e retroperitoneal, para os animais participantes do Experimento II.

4.4.1.1 Umidade da carcaça

A umidade foi determinada a partir da secagem de toda a carcaça em estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias. Para tanto, as carcaças foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio. O tórax e o abdômen dos animais foram abertos ao máximo, permitindo a secagem eficiente. O conteúdo de umidade presente na carcaça foi determinado pela diferença entre os valores obtidos na pesagem da carcaça antes e após a secagem da mesma. O percentual de umidade foi calculado a partir do valor absoluto de umidade (g) dividido pelo peso corporal final (g) e o resultado multiplicado por 100.

$$\% \text{ umidade corporal} = \text{umidade absoluta (g)} / \text{peso corporal final (g)} \times 100$$

4.4.1.2 Lipídios

Toda a carcaça seca foi envolvida por papel filtro (Whatman) e, por meio da técnica de extração com éter etílico (Synth[®]) como solvente, removeu-se todo o lipídio, utilizando-se o extrator de Soxhlet. Esta técnica consiste em colocar a amostra em um tubo extrator, adicionar éter em um balão coletor que está agregado ao extrator e aquecer o balão com a finalidade de fazer o éter evaporar. O éter atinge a amostra e condensa, pois o tubo extrator é resfriado externamente com água corrente conectada a um condensador. Ao condensar, o éter lava a amostra, extraindo o lipídio que se acumula no balão coletor.

A extração foi mantida por dois dias e, ao final do procedimento, o solvente foi recuperado e os balões pesados. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e do balão com lipídios forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal (% G) foi calculado dividindo-se a

4. Material e Métodos

quantidade de gordura da carcaça pelo peso corporal final e multiplicando esse valor por 100, conforme a fórmula:

$$\% G = \text{gordura absoluta (g)} / \text{peso corporal final} \times 100$$

4.4.1.3 Massa corporal livre de gordura (MLG)

O valor absoluto da massa corporal livre de gordura foi calculado a partir da diferença entre o peso corporal final (g) e o valor absoluto de lipídio (g). O percentual MLG é a divisão entre o seu valor absoluto pelo peso corporal final (g) multiplicado por 100.

$$\text{MLG} = \text{peso corporal final (g)} - \text{gordura total (g)}$$

$$\% \text{MLG} = \text{peso corporal final (g)} / \text{gordura total (g)} \times 100$$

4.5 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações (LIMA *et al.*, 1998). Os coxins adiposos EPI foram retirados, picados com tesoura em finos fragmentos e incubados em tampão digestivo (DMEM, HEPES 20 mM, BSA 4%, colagenase II – Sigma® – 1,0 mg/mL, pH = 7,45) por cerca de 30 minutos a 37°C em banho-maria com agitação (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão (tampão EHB – sais de EARLE, HEPES 20 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH = 7,45) mantido a 37 °C.

4. Material e Métodos

Para análise morfológica, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico acoplado a câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 - MOTIC). Utilizou-se o programa Motic-Images Plus 2.0 para medição da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio (foram medidas 50 células/animal/tecido). A partir deste valor, assumindo-se que o adipócito isolado é esférico, foram calculados o volume e a área de superfície celular média, de acordo com as fórmulas propostas por Fine e Girolamo (1997).

$$V = [(\pi/6) \times D^3]/1000$$

D é o diâmetro médio de 100 adipócitos (μm);

V é o volume médio.

A divisão por 1.000 visa expressar o volume em picolitros (pL) (DI GIROLAMO, MENDLINGER e FERTIG, 1971).

4.6 Parâmetros séricos

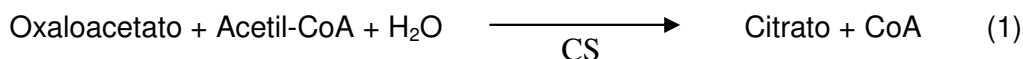
4.6.1 Ácidos graxos não esterificados (AGNE)

A concentração sérica de ácidos graxos não esterificados foi quantificada por método colorimétrico enzimático, utilizando *kit* comercial da WAKO (Pure Chemical Industries, Japan) segundo o princípio a seguir: ácidos graxos não esterificados presentes na amostra são transformados em Acil-CoA, AMP e ácido fosfórico (PPi) pela enzima Acil-CoA Sintetase (ACS) na presença da Coenzima A (CoA) e do sal dissódico do trifosfato de adenosina (ATP). A reação origina Acil-CoA, que é transformada em 2,3-trans-Enoil-CoA e peróxido de hidrogênio sob a ação da enzima Acil-CoA-Oxidase (ACOD). Na presença da peroxidase, forma-se então um complexo colorido azul-violeta entre a 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina (MEHA) e a 4-Aminoantipirina (4-AA), por acoplamento oxidativo. A concentração de AGNE é determinada medindo-se a absorção do complexo azul-violeta formado.

4.6.2 Determinação da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS)

Para a dosagem da atividade máxima da enzima CS utilizou-se o músculo sóleo previamente descongelado, que foi homogeneizado em tampão de extração, constituído de Tris Base 50 mM, EDTA 1 mM em pH 7,4. Para a homogeneização foi usado homogeneizador elétrico tipo *polytron* (Ika T10 basic, Guangzhon Economic & Technologica, China) na velocidade máxima, em 3 *bursts* de cerca de 10 segundos cada. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper as células musculares. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70 % e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas. Posteriormente, este homogeneizado foi centrifugado (Jouan BR4i) por 30 segundos, 4 °C a 7.000 rpm e, do sobrenadante, uma amostra foi separada para a dosagem de proteínas totais e 20 µl utilizados para a dosagem enzimática.

A atividade máxima da CS foi determinada segundo protocolo modificado de *Alp et al.* (1976), a partir da quantificação do amarelo formado entre a CoA liberada na reação (1) com o DTNB contido no tampão de ensaio:



O tampão de ensaio foi constituído de Tris Base 100 mM e DTNB (5,5'-ditio-bis – 2 – nitrobenzoic acid) 0,2 mM, triton 1 % e acetil-CoA em pH 8,1.

A reação foi iniciada pela adição de 15 µl de oxaloacetato 0,5 mM ao meio de ensaio e a leitura realizada em leitor de microplaca (Synergy HT, Biotek). Os resultados foram expressos em nmol / minuto x mg proteína⁻¹.

4.6.3 Citocinas

As dosagens de citocinas foram realizadas pelo método imunoenensaio multiplex, utilizando *kit rat serum adipokine panel 7 LINCOpex*, para dosagem simultânea de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e leptina, e o *kit Rat Adiponectin Single-plex*, para a determinação da

4. Material e Métodos

dosagem da concentração sérica de adiponectina, ambos os *kits* são produzidos pela LINCO Research (EUA). As determinações foram feitas em equipamento automático Lincoplex 200.

Os *kits LINCOpnex* utilizam a tecnologia *Multiple Analyte Profiling* (xMAP™), que compreende processo de coloração interna de microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção precisa destes dois fluorocromos, foram criados conjuntos de esferas, cada um com sua individualização baseada em um código de cor. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito-específico. Utiliza-se então um anticorpo de detecção biotinizado que se liga ao analito específico e o resultado final é amplificado através de incubação com conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina. As microesferas foram lidas no equipamento Lincoplex 200, através de sistema duplo de *lasers* que incide sobre as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de *laser* detecta a microesfera (com um código de cor específico para o ensaio), enquanto o outro *laser* quantifica o sinal de repórter em cada microesfera.

As dosagens foram realizadas nas dependências do Instituto Gênese de Análises Científicas, da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda (São Paulo - SP).

4.7 Determinação da concentração de proteínas teciduais no tecido adiposo EPI e no músculo sóleo

A concentração de proteínas totais no tecido adiposo EPI e no músculo sóleo dos animais foi determinada através de um *kit* comercial (*BCA Protein Assay kit – Pierce*) que forneceu os reagentes para o ensaio, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.8 Western Blotting

4.8.1 Extração de proteínas

Inicialmente, o tecido adiposo EPI foi dissecado, separado uma amostra de 300 a 400 mg e pulverizado em nitrogênio líquido por cerca de dez segundos. Posteriormente, foi mantido em microtubos até a extração.

4. Material e Métodos

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

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

4.8.2 Preparo do gel de poliacrilamida

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

4.8.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western Blotting*

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

4.8.4 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].

4.8.5 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 min, 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), fosfo-AMPKα (Thr¹⁷²)], [(1:500

4. Material e Métodos

fosfo-JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵), 1:250 fosfo-IRS1 (Ser³⁰⁷), fosfo-PKC θ (Thr⁵³⁸), fosfo-IKK α/β (Ser^{176/180}); 1:1000 para Akt, IRS1, JNK, IKK, PKC e AMPK totais] em 10 mL de PBST a 2 % do pó de agente bloqueador, proveniente do *kit ECL Advance*, e utilizado para a incubação das membranas *overnight*, sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST, e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em PBST, por 1 h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com agitação.

4.8.6 Revelação com sistema quimioluminescente

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

4.8.7 Stripping

Após a revelação das membranas com as proteínas de interesse, as mesmas foram utilizadas para verificar as proteínas totais ou fosforiladas, não reveladas anteriormente, e a proteína normalizadora β -actina. Para tanto, adotou-se o procedimento de *stripping* da membrana, que consiste na retirada dos anticorpos da superfície da mesma.

O processo teve início com três lavagens de 5 minutos cada com 20 mL de PBST. Em seguida, as membranas permaneceram durante 30 minutos, sob agitação em geladeira a 4 °C, em 20 mL de solução de *stripping* preparada no laboratório (pH 2,8) contendo glicina, cloreto de sódio e água. Finalizada esta etapa, essa solução foi desprezada e mais 20 mL de solução de *stripping*, adicionada de 1.250 μ L de solução de hidróxido de sódio 1N, foram colocados no recipiente com a membrana, assim ficando por mais 30 minutos, sob agitação em geladeira a 4 °C. Ao término, as soluções foram desprezadas e as membranas foram novamente lavadas três vezes, durante 5 minutos, com 20 mL de PBST. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

4. Material e Métodos

Para as novas proteínas de interesse, os procedimentos descritos acima, nos tópicos “sondagens das proteínas com anticorpos” e “revelação com sistema quimioluminescente”, foram retomados, enquanto que, para a incubação com anticorpo primário monoclonal anti- β -actina, as membranas foram bloqueadas com proteínas de albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, mais o anticorpo em diluição 1:40.000, por 60 minutos, sob agitação em geladeira a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 minutos, com PBST, e, para finalizar, seguiram-se os procedimentos de revelação.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro-padrão, utilizando-se o *software* estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc). Os dados foram primeiramente submetidos aos testes de normalidade e de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett.

Para comparação entre apenas dois grupos (T8 e S8) utilizou-se o teste de T-*Student* (*T-test*) não pareado e *two-tailed*. As comparações entre os grupos (DT, DTL, T14 e S14) foram avaliadas pela análise de variância fatorial (ANOVA fatorial), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes. Para ambas as etapas e para todas as análises, adotou-se valor de significância de 0,05.

6. RESULTADOS

Os efeitos do destreinamento físico, da suplementação crônica de LEU e do treinamento físico sobre ingestão energética, massa e composição corporal, volume de adipócitos isolados, glicemia, atividade enzimática, marcadores de inflamação, expressão e fosforilação das proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no tecido adiposo periepídídimal serão apresentados a seguir.

6.1 Experimento I

6.1.1 Evolução da massa corporal

A tabela 2 apresenta a massa corporal inicial e final, além do ganho de massa dos animais durante o experimento I. Observa-se que os grupos apresentavam média de massa corporal inicial semelhante e que houve diferença significativa na massa corporal final e na variação desta ao longo do experimento, quando o grupo T8 apresentou redução quando comparado ao S8. Aliado a este fato, constatou-se que a massa corporal começou a apresentar diferença significativa entre os grupos a partir da quinta semana de experimento, na qual verificamos que o grupo T8 apresentou evolução da massa corporal inferior ao grupo S8 (**Figura 3**).

Tabela 2. Massa e variação da massa corporal referente ao experimento I.

| | T8 | S8 | p |
|---------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| Massa inicial (g) | 260,3 ± 6,51 | 259,3 ± 8,36 | 0,923 |
| Massa final (g) | 390,7 ± 5,88* | 426,7 ± 11,3 | 0,011 |
| Variação da massa corporal (g) | 130,4 ± 3,86* | 167,4 ± 11,09 | 0,005 |

Dados expressos como média ± erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7). * Diferença significativa na massa corporal final e na variação desta entre os grupos T8 e S8 ($p < 0,05$).

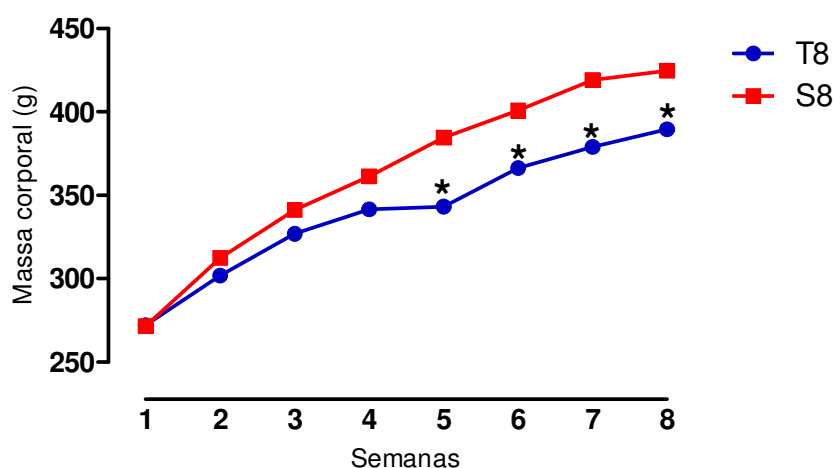


Figura 3. Evolução semanal da massa corporal dos animais do experimento I.

Resultados são expressos como média \pm erro padrão T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$). * A partir da quinta semana houve diferenças significativas ($p < 0,05$).

6.1.2 Consumo de ração

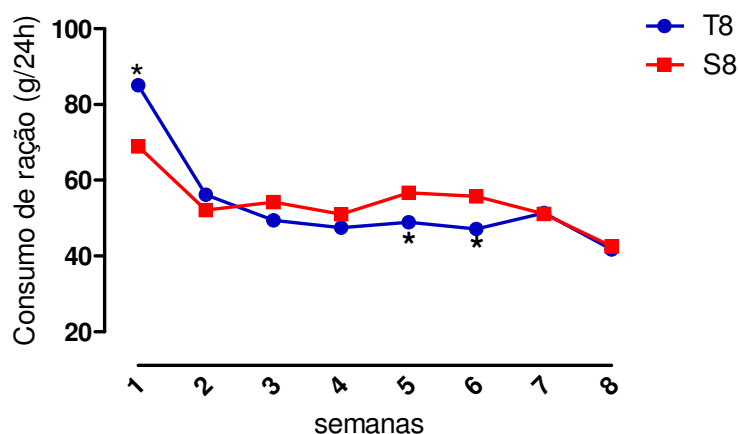
Quanto ao consumo médio de ração durante todo o período experimental, observa-se que não houve diferenças significativas entre os grupos T8 e S8, tanto para o consumo médio absoluto quanto para o consumo relativo. Também não houve diferença significativa para o consumo relativo de macronutrientes (**Tabela 3**). Entretanto, ao avaliarmos o consumo médio semanal, verificamos que, na primeira semana, o grupo T8 apresentou consumo de ração significativamente maior quando comparado ao grupo S8 ($p = 0,001$) e que na quinta ($p = 0,032$) e na sexta ($p = 0,025$) semanas houve inversão no consumo, ou seja, o grupo S8 consumiu significativamente mais ração que os animais do grupo T8. Para as demais semanas, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) (**Figura 4**).

6. Resultados

Tabela 3. Consumo médio de ração e macronutrientes durante o período experimental dos grupos T8 e S8.

| | T8 | S8 | <i>p</i> |
|-----------------------------|--------------|--------------|----------|
| Consumo médio (g) | 53,42 ± 4,74 | 54,07 ± 2,61 | 0,907 |
| Consumo médio (g/100 g/dia) | 2,26 0,03 | 2,38 0,10 | 0,350 |
| Kcal/100 g/dia | 8,62 ± 0,15 | 9,06 ± 0,39 | 0,346 |
| CHO (kcal/100 g/dia) | 6,17 ± 0,10 | 6,48 ± 0,28 | 0,340 |
| PTN (kcal/100 g/dia) | 1,64 ± 0,02 | 1,72 ± 0,07 | 0,349 |
| LIP (kcal/100 g/dia) | 0,81 ± 0,01 | 0,85 ± 0,03 | 0,373 |

Dados expressos como média ± erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7). CHO: carboidratos; PTN: proteína; LIP: lipídios.

**Figura 4.** Consumo médio semanal durante o experimento I.

Dados expressos como média ± erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7). * Maior consumo de ração na primeira semana para o grupo T8 e, na quinta e na sexta semanas, para o grupo S8 ($p < 0,01$, $p = 0,03$, $p = 0,02$, respectivamente).

6.1.3 Massa dos coxins adiposos e composição corporal

Na tabela 4 estão apresentados os valores da massa de coxins adiposos SUB, EPI e RET do experimento I. Observamos influência do treinamento físico sobre a massa de todos

6. Resultados

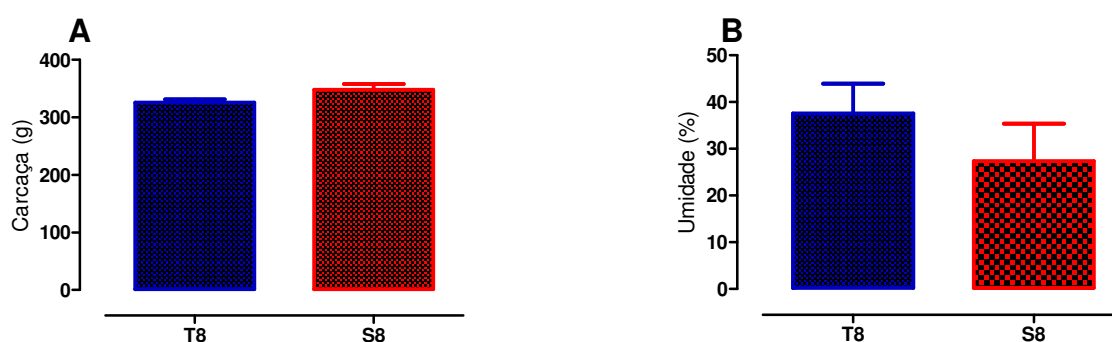
os coxins adiposos e sobre a soma deles. O grupo T8 apresentou redução da massa adiposa em relação ao grupo S8.

Tabela 4. Peso dos coxins adiposos SUB, EPI e RET e soma (Σ) de todos os depósitos referentes ao experimento I.

| | T8 | S8 | <i>p</i> |
|---------------------|---------------|--------------|----------|
| Subcutâneo (g) | 4,81 ± 0,22* | 12,72 ± 3,35 | < 0,01 |
| Periepididimal (g) | 7,35 ± 0,58* | 14,51 ± 2,51 | 0,011 |
| Retroperitoenal (g) | 5,28 ± 0,45* | 10,96 ± 1,57 | 0,002 |
| Σ (g) | 17,45 ± 0,93* | 38,19 ± 7,30 | < 0,01 |

Dados expressos como média ± erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7). * O grupo T8 apresentou diferença significativa para massa de todos os coxins adiposos e da soma destes em relação ao grupo S8.

Os valores da composição corporal estão apresentados na figura 5. Podemos verificar que, em relação à massa da carcaça e ao percentual de umidade, não houve diferença significativa entre os grupos (**Figuras 5A e 5B**, respectivamente). Contudo, o TF foi efetivo em aumentar a MLG e reduzir o percentual de gordura (% G) quando comparados os grupos do experimento I (**Figuras 5C e 5D**, respectivamente).



6. Resultados

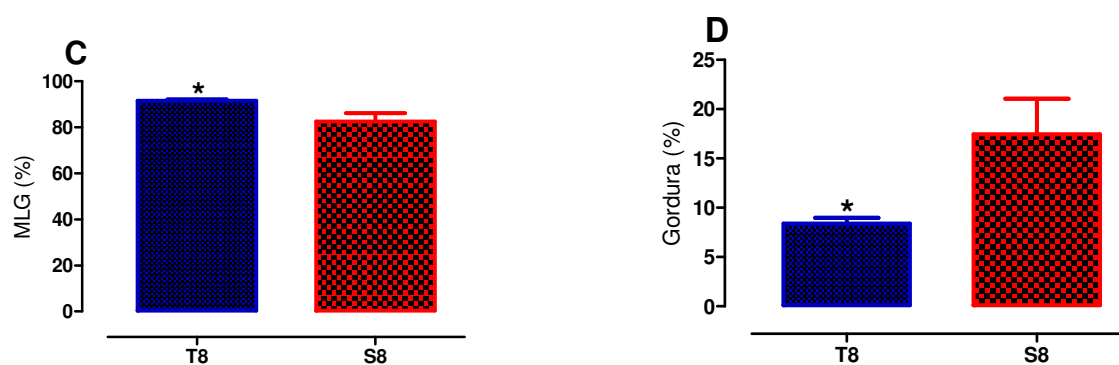


Figura 5. Massa e composição química da carcaça referente ao experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$). * O grupo T8 apresentou diferença estatisticamente significativa para MLG e % G quando comparado ao grupo S8 ($p < 0,01$, para ambos). Figura A: massa absoluta da carcaça; figura B: percentual de umidade da carcaça; figura C: percentual de MLG; figura D: percentual de gordura.

6.1.4 Volume de adipócitos do tecido EPI

De acordo com os dados apresentados na figura 6, oito semanas de TF são suficientes para reduzir de forma significativa o volume dos adipócitos isolados do tecido adiposo EPI, quando comparados os grupos do experimento I ($p = 0,01$).

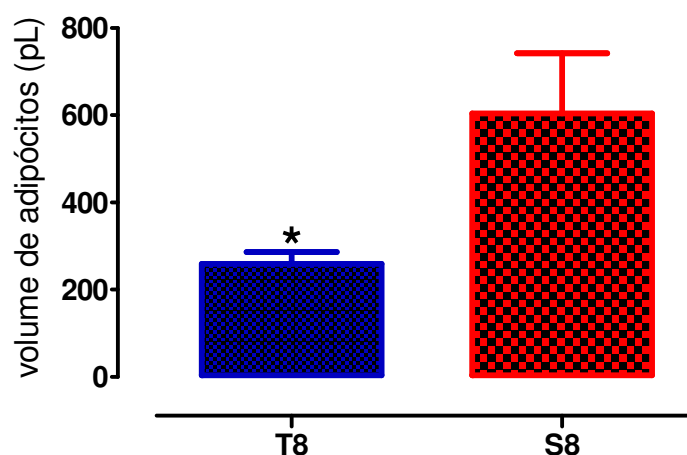


Figura 6. Volume dos adipócitos do tecido adiposo EPI do experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$). * Diferença estatisticamente significativa.

6.1.5 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

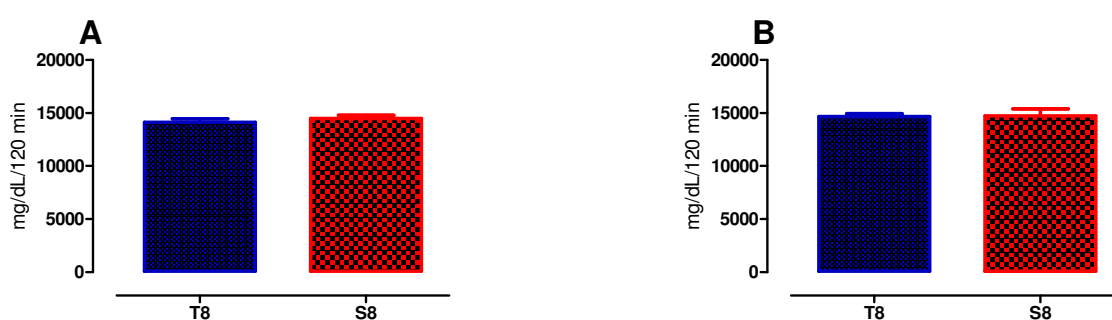
Os dados apresentados na tabela 5 representam a glicemia de jejum no início do protocolo experimental (semana 0) e no final do experimento (semana 8). Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos T8 e S8. Verificamos ainda que não houve variação significativa para o mesmo grupo nas diferentes semanas.

Tabela 5. Glicemia de jejum na semana 0 e na semana 8 referente ao experimento I.

| Glicemia (mg/dl) | T8 | S8 | <i>p</i> |
|------------------|--------------|--------------|----------|
| Semana 0 | 82,17 ± 0,70 | 83,50 ± 1,31 | 0,391 |
| Semana 8 | 80,25 ± 1,77 | 83,67 ± 1,58 | 0,191 |

Dados expressos como média ± erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7).

Para a área sob a curva do TOTG, os grupos não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das situações analisadas. Nas figuras 7A e 7B estão os dados referentes às semanas 0 e 8, respectivamente, para os grupos T8 e S8; nas figuras 7C e 7D, os dados referentes aos grupos T8 e S8, respectivamente, para as semanas 0 e 8.



6. Resultados

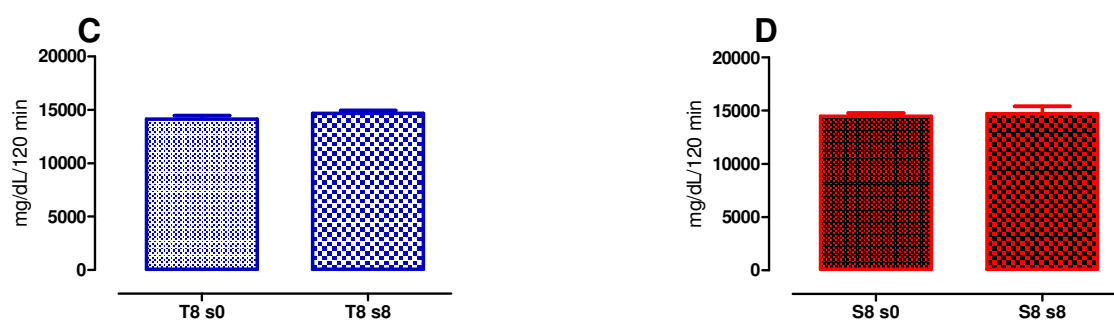


Figura 7. Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose referente ao experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$). s0: semana inicial; s8: última semana do protocolo experimental.

6.1.6 Ácidos graxos não esterificados

Na figura 8 verifica-se que, apesar de forte tendência, as concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados não diferiram significativas entre os grupos T8 e S8 ($p = 0,099$).

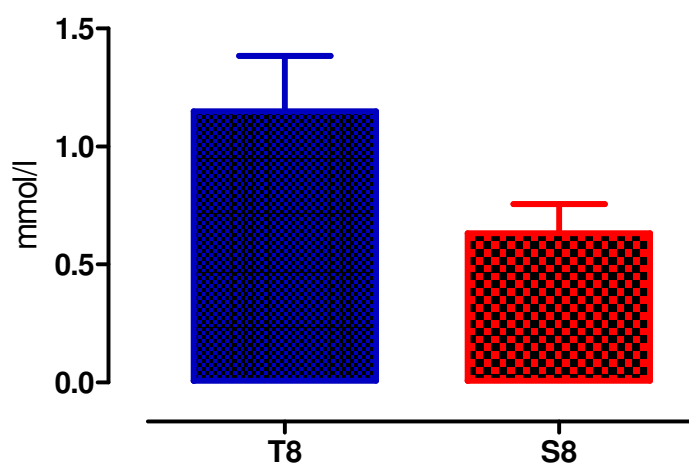


Figura 8. Concentração de ácidos graxos não esterificados referentes ao experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$).

6.1.7 Concentrações séricas de citocinas

Na Tabela 6 estão representados os dados referentes às concentrações séricas de adiponectina, leptina, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 referentes ao experimento I. Podemos observar que TF exerceu efeito estatisticamente significativo sobre as concentrações séricas de leptina quando comparados os grupos T8 e S8; para as demais adipocinas não verificamos diferenças significativas nas concentrações.

Tabela 6. Concentrações séricas das citocinas adiponectina, leptina, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 referentes ao experimento I.

| | T8 | S8 | <i>p</i> |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|----------|
| Leptina (ng/mL) | 8,68 \pm 0,78* | 19,02 \pm 2,03 | < 0,001 |
| Adiponectina (pg/mL) | 33.07 \pm 3,89 | 34.16 \pm 1,14 | 0,830 |
| TNFα (pg/mL) | 1,89 \pm 0,01 | 2,35 \pm 0,30 | 0,165 |
| IL-1β (pg/mL) | 8,48 \pm 0,38 | 7,10 \pm 1,69 | 0,478 |
| IL-6 (pg/mL) | 426,5 \pm 131,1 | 331,0 \pm 127,5 | 0,614 |
| IL-10 (pg/mL) | 91,51 \pm 16,61 | 101,5 \pm 21,35 | 0,712 |

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7). * Diferença estatisticamente significativa.

6.1.8 Expressão proteica no tecido adiposo EPI

6.1.8.1 Expressão e fosforilação da proteína quinase Akt

Na figura 9, estão representados os resultados de expressão proteica e fosforilação no resíduo de treonina 308 da Akt referentes aos animais do experimento I, obtidos pela técnica de *Western Blotting*. Podemos observar que não houve diferença na fosforilação ($p = 0,142$) (**Figura 9A**), na quantidade total ($p = 0,610$) desta proteína entre os grupos (**Figura 9B**).

6. Resultados

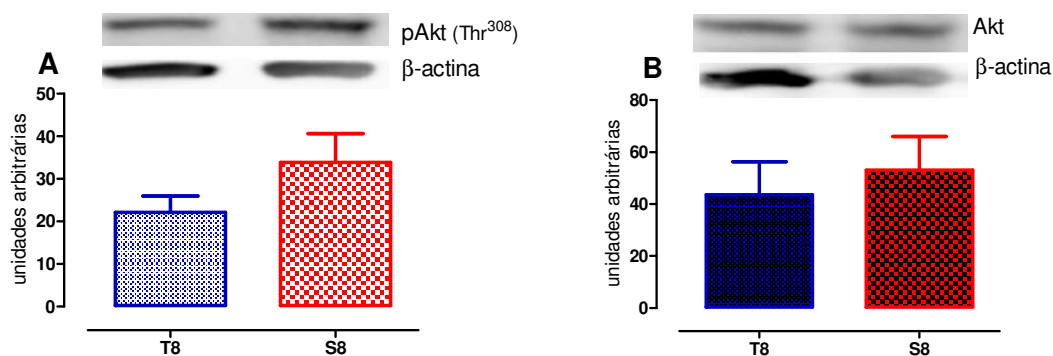


Figura 9. Expressão e fosforilação da Akt, no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7).

6.1.8.2 Expressão da proteína quinase IRS1

Na figura 10, apresentamos os resultados referentes à expressão da proteína quinase IRS-1, obtidos pela técnica de *Western Blotting*. Observamos que os valores não diferem estatisticamente entre os grupos T8 e S8 do experimento I ($p = 0,646$).

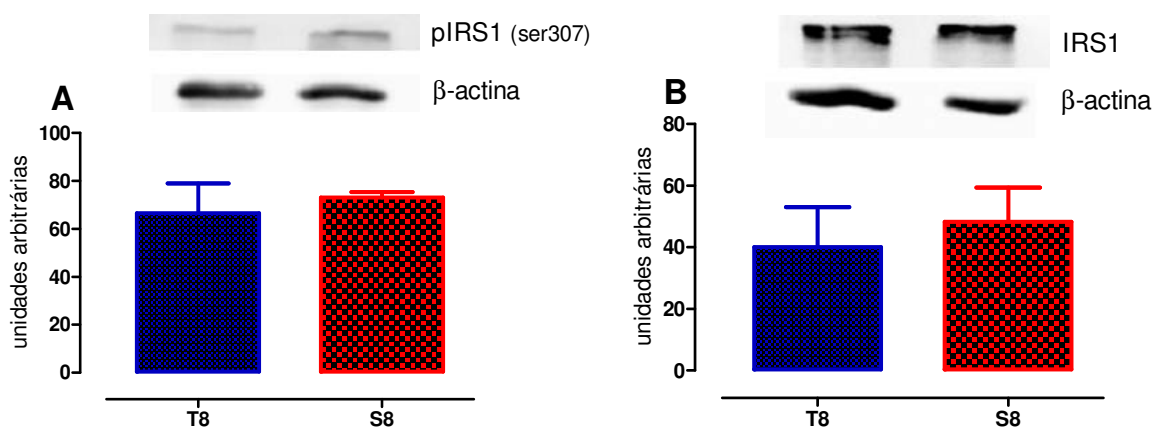


Figura 10. Expressão e fosforilação da IRS1 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas (n = 8); S8: grupo sedentário por oito semanas (n = 7).

6.1.8.3 Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2

Na figura 11, verificamos que o grupo T8 apresentou fosforilação no resíduo de treonina 183 e de tirosina 185 da JNK2 significativamente menor que o grupo S8 ($p = 0,014$) (**Figura 11A**). Quando analisamos os níveis da JNK2 total, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos do experimento I ($p = 0,294$) (**Figura 11B**).

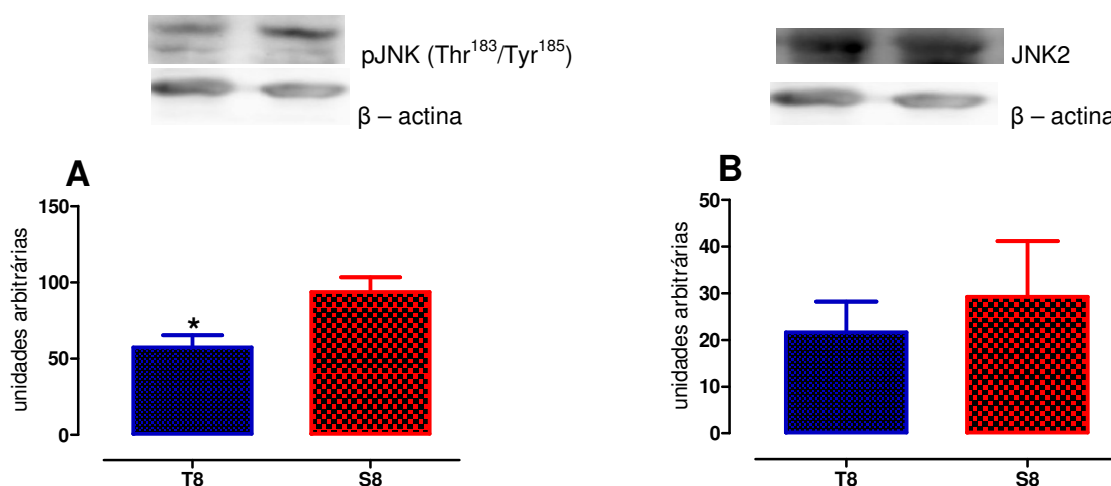


Figura 11. Expressão e fosforilação da JNK2, no tecido adiposo EPI dos animais do experimento I.

Dados expressos como média \pm erro padrão. T8: grupo treinado por oito semanas ($n = 8$); S8: grupo sedentário por oito semanas ($n = 7$). * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

6.2 Experimento II

6.2.1 Evolução da massa corporal

A tabela 7 apresenta a massa corporal inicial, ao final da oitava e da décima quarta semanas do protocolo experimental, além do ganho de massa dos animais durante este período, para o experimento II. Observa-se que os grupos apresentavam média de massa corporal inicial semelhante e que houve redução significativa na massa corporal ao final da oitava semana, quando comparados os grupos que foram submetidos ao TF (DT, DTL e T14) com o grupo S14, e aumento na décima quarta semana, quando comparados os grupos DT, DTL e S14 com o grupo T14. Quando verificado o ganho de massa corporal entre as semanas 1-8, observamos que houve aumento significativo, quando comparados

6. Resultados

os grupos DT, DTL e T14 com o grupo S14. Entre as semanas 9-14, notamos que os grupos DT e DTL diferiram significativamente tanto do grupo T14 quanto do S14. O ganho de massa corporal ao final da décima quarta em relação à nona semana foi de 23 %, 28,3 %, 2 % e 8,6 %, para os grupos DT, DTL, T14 e S14, respectivamente. Interessantemente, observamos que os grupos submetidos ao destreino físico apresentaram massa corporal final semelhante ao grupo S14 e que, a variação na massa corporal dos grupos DT e DTL foi superior aos grupos T14 e S14, ou seja, a suplementação com LEU não foi capaz de evitar este maior incremento.

Tabela 7. Massa corporal inicial, nas semanas oito e quatorze do protocolo experimental e variação entre as semanas, referente ao grupo experimental II.

| | DT | DTL | T14 | S14 | <i>p</i> |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|
| Massa corporal inicial (g) | 319,8 ± 9,60 | 324,8 ± 12,13 | 301,9 ± 12,72 | 321,6 ± 10,93 | 0,5 |
| Massa corporal com 8 semanas (g) | 431,1 ± 15,00 ^a | 430,0 ± 12,80 ^a | 427,1 ± 15,38 ^a | 515,1 ± 16,95 ^b | < 0,01 |
| Massa corporal com 14 semanas (g) | 531,1 ± 14,29 ^a | 538,9 ± 19,03 ^a | 437,8 ± 13,44 ^b | 558,0 ± 16,69 ^a | < 0,01 |
| Variação da massa corporal semanas 1-8 (g) | 111,3 ± 13,42 ^a | 105,2 ± 9,04 ^a | 125,2 ± 6,10 ^a | 193,5 ± 8,07 ^b | < 0,01 |
| Variação da massa corporal semanas 9-14 (g) | 98,89 ± 6,51 ^a | 118,2 ± 11,22 ^a | 7,89 ± 5,82 ^b | 44,12 ± 3,24 ^c | 0,048 |

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.2 Aminograma e consumo da ração

Para nos certificarmos de que a quantidade de LEU acrescentada à ração AIN93-M fosse, de fato, representar acréscimo de 5 % em relação à ração controle, realizamos um aminograma e observamos que a ração AIN93-M apresentou 1,16 % de LEU e que a ração AIN93-M + LEU apresentou 6,26 % de LEU; a diferença correspondeu a 5,1 %.

6. Resultados

A figura 12 apresenta o consumo médio de ração das primeiras oito semanas do experimento II. Observamos que, assim como no experimento I, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais neste período.

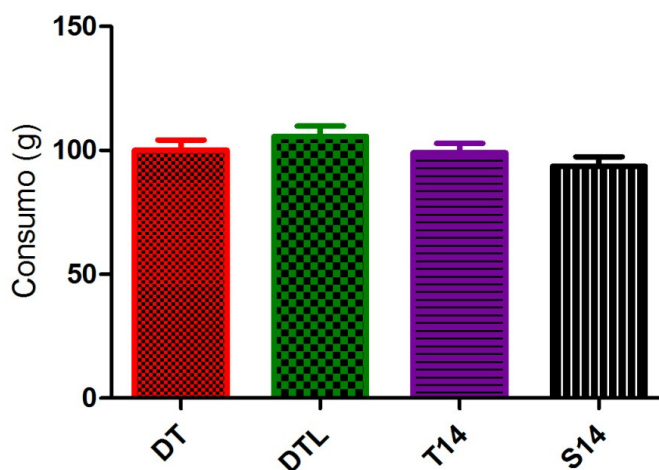


Figura 12. Consumo médio das oito semanas iniciais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$).

Na figura 13, verificamos o consumo médio de todo o período do experimento II. Podemos observar que o grupo DTL consumiu significativamente mais ração que o grupo T14 ($p = 0,02$). Entre os demais grupos, não houve diferença significativa.

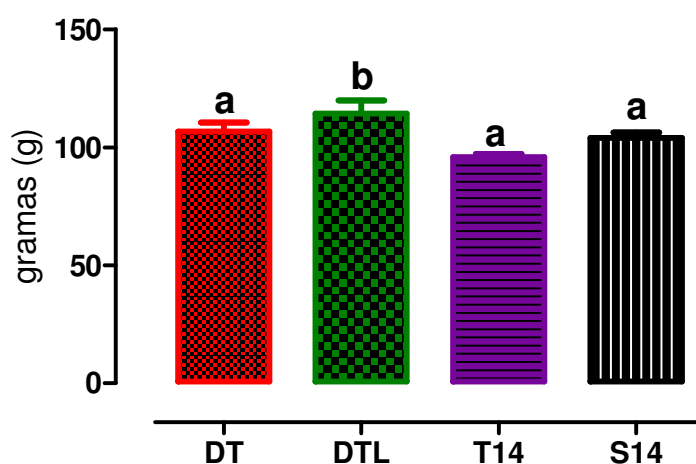


Figura 13. Consumo médio de ração durante todo o período do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6. Resultados

Analisamos também o consumo semanal de ração durante todo o experimento II. Para as primeiras oito semanas, não encontramos diferenças significativas, porém, ao avaliarmos as semanas seguintes, observamos que, já na primeira semana de destreino, o grupo DTL consumiu significativamente mais ração quando comparado aos demais grupos; na segunda semana ambos, DT e DTL, apresentaram consumo significativamente maior que o grupo T14 e o consumo do grupo DTL diferiu ainda do grupo S14; na terceira semana de destreino, os grupos DT e DTL diferiram dos grupos T14 e S14. Para as demais semanas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 8**).

Tabela 8. Consumo médio de ração no período de destreino físico do experimento II.

| Consumo médio (g) | DT | DTL | T14 | S14 | p |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| Semana 9 | 120,0 ± 2,77 ^a | 128,4 ± 2,38 ^b | 94,03 ± 3,44 ^a | 103,8 ± 9,98 ^a | p = 0,01 |
| Semana 10 | 127,8 ± 5,24 ^a | 149,1 ± 4,88 ^{ab} | 91,34 ± 1,05 ^c | 100,4 ± 9,77 ^{ac} | p < 0,01 |
| Semana 11 | 127,3 ± 3,33 ^a | 139,7 ± 6,08 ^a | 97,25 ± 1,70 ^b | 101,0 ± 9,98 ^b | p < 0,01 |
| Semana 12 | 123,6 ± 2,72 | 133,7 ± 6,42 | 104,8 ± 2,40 | 105,4 ± 11,86 | p > 0,059 |
| Semana 13 | 77,84 ± 1,54 | 92,26 ± 4,83 | 102,5 ± 4,72 | 80,10 ± 9,57 | p > 0,072 |
| Semana 14 | 102,3 ± 1,03 | 98,26 ± 15,99 | 89,26 ± 3,61 | 90,20 ± 9,15 | p > 0,727 |

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.3 Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada

A partir da tabela 9 constata-se que os grupos não diferiram entre si quando comparadas as concentrações séricas dos aminoácidos de cadeia ramificada.

6. Resultados

Tabela 9. Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada referente ao experimento II.

| | DT | DTL | T14 | S14 | <i>p</i> |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| Leucina (nmol/mL) | 18,20 ± 0,17 | 19,20 ± 1,46 | 18,67 ± 0,73 | 18,61 ± 1,33 | 0,955 |
| Isoleucina (nmol/mL) | 11,54 ± 0,46 | 11,84 ± 0,87 | 12,26 ± 0,52 | 11,3 ± 0,67 | 0,756 |
| Valina (nmol/mL) | 22,34 ± 0,74 | 24,94 ± 1,82 | 23,32 ± 0,90 | 20,31 ± 0,32 | 0,091 |

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8).

6.2.4 Massa dos coxins adiposos e composição corporal

Na tabela 10 estão representados os resultados referentes à massa dos coxins adiposos EPI e RET, além da soma destes. Verificamos que, para a massa do RET, os grupos DT, DTL e S14 apresentaram diferença significativa em relação ao grupo T14; já para a massa do EPI, verificamos que os grupos DT e DTL foram estatisticamente semelhantes entre si e que diferiram dos grupos T14 e S14; este último, por sua vez, também diferiu significativamente do grupo T14; para a soma dos coxins adiposos. Observamos que os grupos DT e DTL foram semelhantes entre si e que diferiram do grupo T14, entretanto, enquanto a soma do grupo DTL foi estatisticamente diferente do grupo S14, o grupo DT apresentou resultado semelhante a este.

Tabela 10. Massa dos coxins adiposos EPI e RET e soma (Σ) de todos os depósitos referentes ao experimento II.

| | DT | DTL | T14 | S14 | <i>p</i> |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| Periepididimal (g) | 12,61 ± 1,25 ^a | 12,21 ± 0,85 ^a | 4,87 ± 0,58 ^b | 15,91 ± 0,79 ^a | < 0,01 |
| Retroperitoneal (g) | 10,66 ± 0,71 ^a | 10,67 ± 1,31 ^a | 3,89 ± 0,34 ^b | 15,04 ± 1,01 ^c | < 0,01 |
| Σ (g) | 24,30 ± 2,23 ^{ac} | 21,84 ± 2,46 ^a | 9,09 ± 1,00 ^b | 31,53 ± 1,88 ^c | < 0,01 |

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6. Resultados

Os valores da composição corporal estão apresentados na figura 14. Podemos verificar que, em relação à massa da carcaça e ao percentual de umidade, não houve diferença significativa entre os grupos (**Figuras 14A e 14B**, respectivamente). Contudo, o destreino físico reverteu, em seis semanas, o ganho de MLG e a redução do % G promovidos pelo TF, quando comparados os grupos DT, DTL, T14 e S14 do experimento II (**Figuras 14C e 14D**, respectivamente).

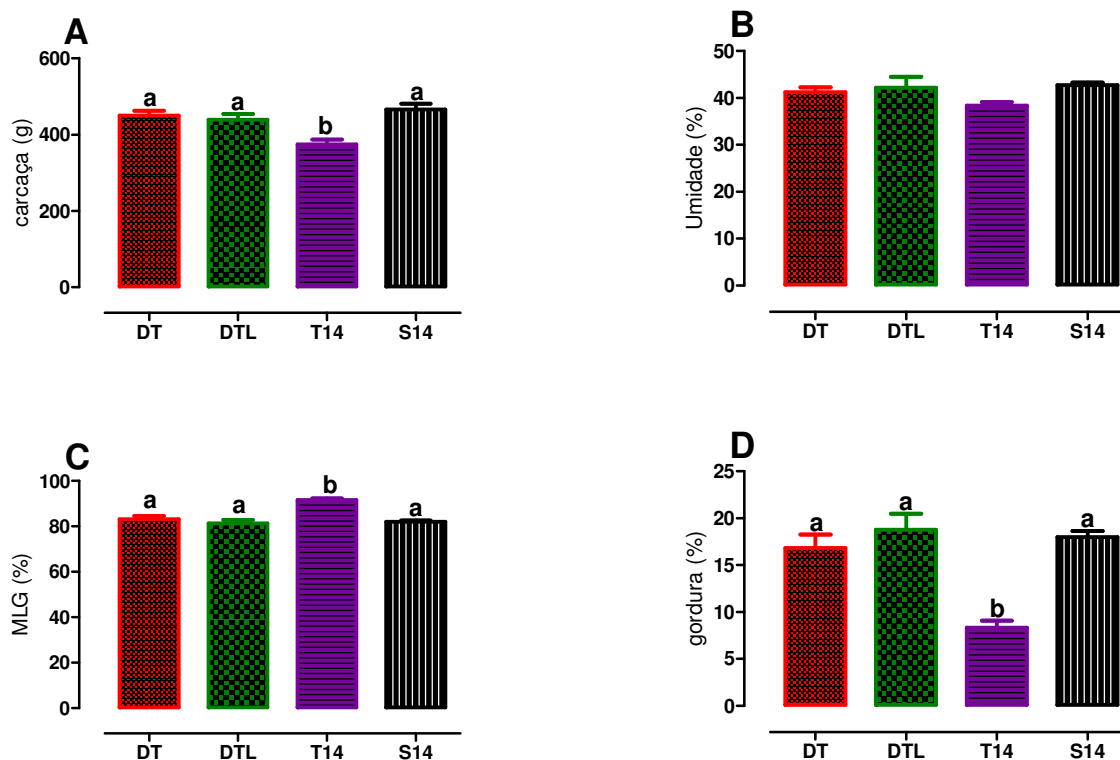


Figura 14. Massa e composição química da carcaça dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreino por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreino por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.5 Volume de adipócitos do tecido adiposo EPI

De acordo com os dados apresentados na figura 15, o volume de adipócitos isolados do tecido adiposo EPI foi semelhante entre os grupos DT, DTL; entretanto, o grupo DT apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo T14; por sua vez, a suplementação de LEU apresentou tendência para elevação do volume de adipócitos do grupo DTL em comparação ao grupo T14.

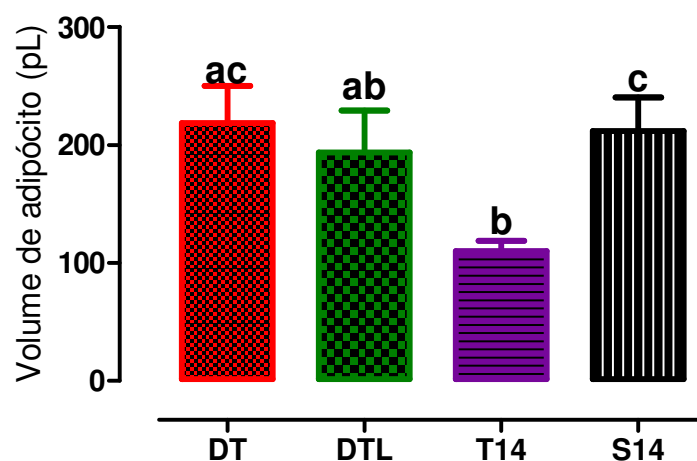


Figura 15. Volume dos adipócitos do tecido adiposo EPI do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.6 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Os dados mostrados na tabela 11 representam a glicemia de jejum no início do protocolo experimental (semana 0), na semana 8 e no final do experimento (semana 13). Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos do experimento II. Quando comparamos o mesmo grupo nas diferentes semanas verificamos que, para os grupos DT, DTL e T14, houve redução significativa na semana 13 em relação à semana 0; o grupo S14, por sua vez, apresentou redução significativa na semana 13 em relação à semana 8.

Tabela 11. Glicemia de jejum nas semanas 0, 8 e 13 durante o experimento II.

| Glicemia (mg/dl) | DT | DTL | T14 | S14 | <i>p</i> |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|
| Semana 0 | 93,50 \pm 3,27 | 91,14 \pm 1,76 | 92,71 \pm 1,01 | 90,67 \pm 1,74 | 0,426 |
| Semana 8 | 90,75 \pm 4,23 | 83,57 \pm 4,05 | 86,50 \pm 3,18 | 94,67 \pm 4,42 | 0,251 |
| Semana 13 | 80,38 \pm 3,74 | 79,00 \pm 1,51 | 81,63 \pm 2,94 | 81,88 \pm 2,02 | 0,882 |

6. Resultados

| | Semana 0 | Semana 8 | Semana 13 | <i>p</i> |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| Grupo DT | 93,50 ± 3,27 ^a | 90,75 ± 4,23 ^{ab} | 80,38 ± 3,74 ^b | 0,042 |
| Grupo DTL | 91,14 ± 1,76 ^a | 83,57 ± 4,05 ^{ab} | 79,00 ± 1,51 ^b | 0,016 |
| Grupo T14 | 92,71 ± 1,01 ^a | 86,50 ± 3,18 ^{ab} | 81,63 ± 2,94 ^b | 0,030 |
| Grupo S14 | 90,67 ± 1,74 ^{ab} | 94,67 ± 4,42 ^a | 81,88 ± 2,02 ^{ab} | 0,023 |

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

Para a área sob a curva do TOTG, os grupos não apresentaram diferenças significativas no teste realizado no início do experimento; na oitava semana de experimento, os grupos que foram submetidos ao TF (DT, DTL e T14) apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo S14 ($p < 0,05$). Nas figuras 16A, 16B e 16C estão os dados referentes às semanas 0, 8 e 13, respectivamente, para os grupos DT, DTL, T14 e S14 (Figura 16).

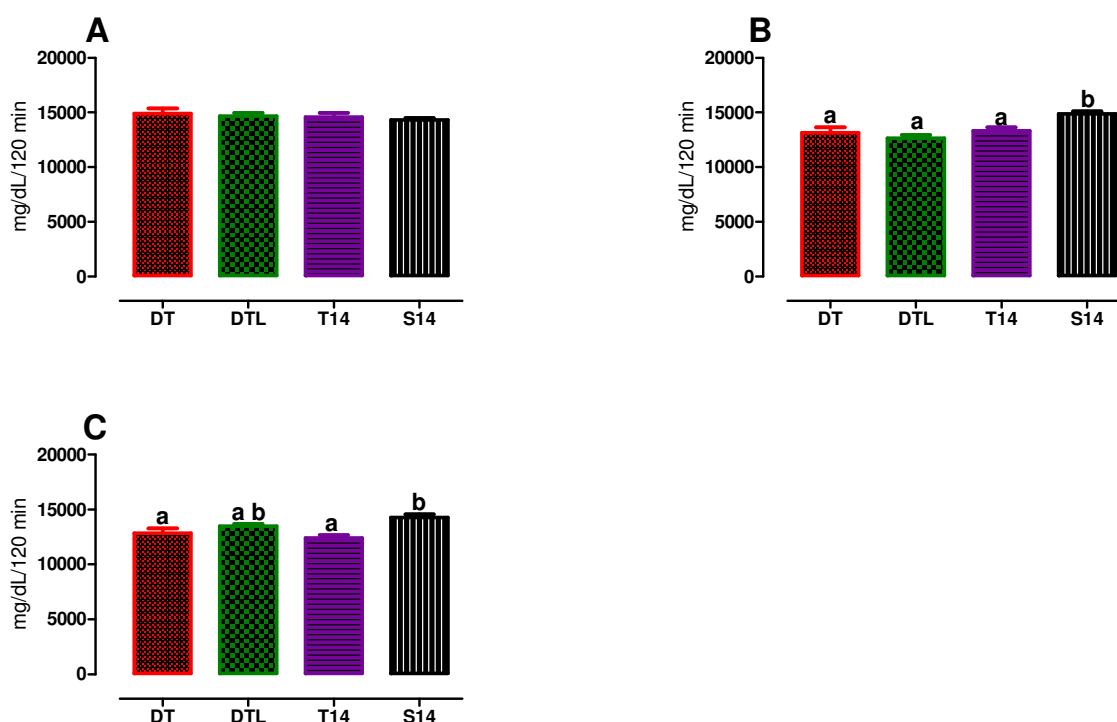


Figura 16. Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose do experimento II.

Dados expressos como média ± erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 9). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6. Resultados

Quando analisamos a área sob a curva do TOTG para o mesmo grupo nos três momentos diferentes (**Figura 17**), verificamos que o grupo DT apresentou diminuição significativa na semana 8 em relação à semana 0 e que esta diferença se manteve na décima terceira semana ($p = 0,012$) (**Figura 17A**); verificamos ainda que o grupo DTL reduziu significativamente a área sob a curva na semana 8, mas que, na semana 13, os valores foram equivalentes às semanas 0 e 8 ($p = 0,003$) (**Figura 17B**); já o grupo T14 apresentou diminuição significativa tanto na semana 8 quanto na semana 13 em relação à semana 0 ($p < 0,01$) (**Figura 17C**); para o grupo S14, por sua vez, não observamos diferenças significativas em nenhum dos momentos do TOTG (**Figura 17D**).

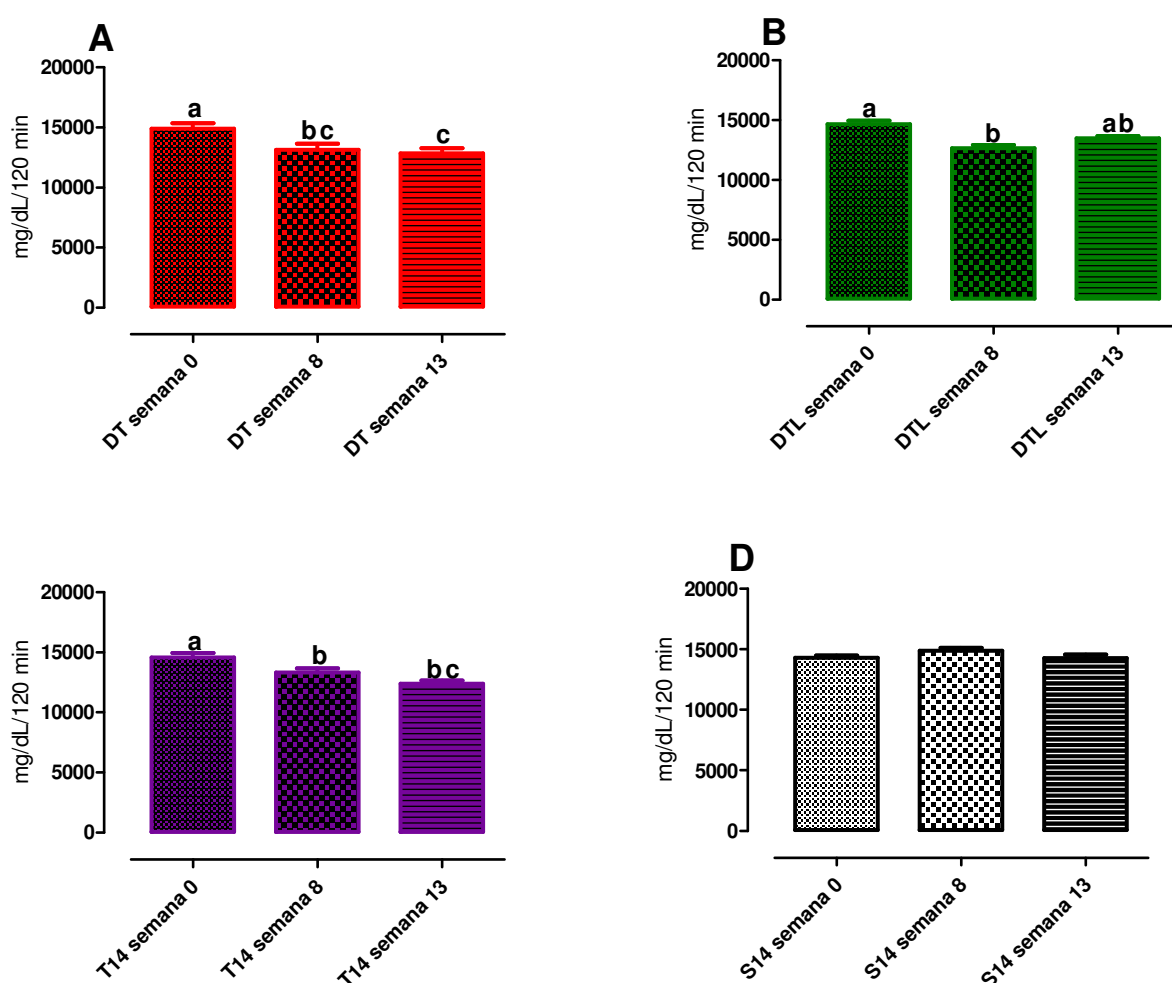


Figura 17. Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose nos três momentos diferentes do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.7 Teste de tolerância à insulina (TTI_{ip})

Na figura 18, podemos observar que a velocidade de desaparecimento da glicose durante teste intraperitoneal de tolerância à insulina (Kitt) foi semelhante nos quatro grupos ($p = 0,542$), indicando que os mesmos apresentam respostas semelhantes quanto à sensibilidade à insulina.

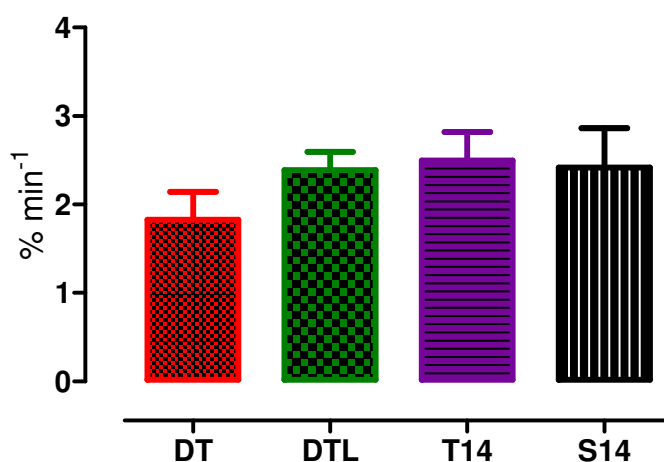


Figura 18. Taxa de decaimento da glicose após administração de insulina (%.min⁻¹) referente ao experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$).

6.2.8 Ácidos graxos não esterificados

Na tabela 12 verifica-se que as concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos do experimento II.

Tabela 12. Concentração de ácidos graxos não esterificados referentes ao experimento II.

| | DT | DTL | T14 | S14 | p |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| NEFA (mmol/l) | 1,10 \pm 0,24 | 0,46 \pm 0,06 | 0,66 \pm 0,22 | 0,92 \pm 0,18 | $p = 0,160$ |

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$).

6.2.9 Atividade máxima da enzima citrato sintase

A figura 19 apresenta os resultados referentes à atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo. Observamos que o grupo T14 apresentou diferença significativa para este parâmetro em relação aos demais grupos do experimento II ($p = 0,008$).

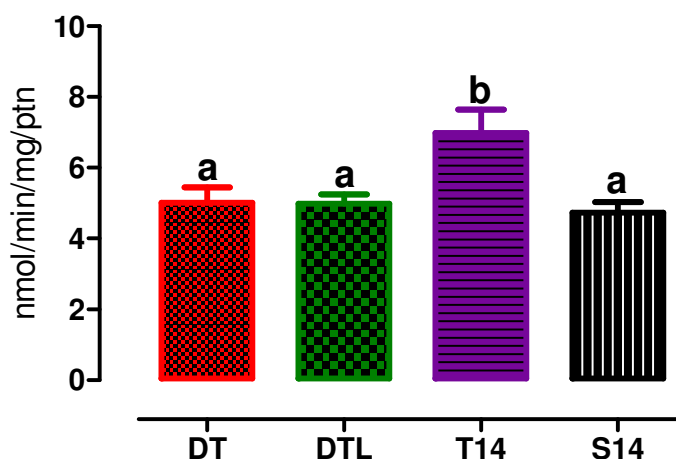


Figura 19. Atividade máxima da enzima citrato sintase referente ao experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.10 Concentrações séricas de citocinas

Na tabela 13 estão representadas as concentrações séricas de adiponectina, leptina, TNF- α , IL-1 β e IL-10 referentes ao experimento II. Podemos verificar que não houve diferença significativa nas concentrações de adiponectina entre os grupos experimentais; o grupo T14 apresentou concentração sérica de leptina inferior aos demais grupos; em relação às concentrações de TNF- α , podemos verificar que o grupo T14 diferiu significativamente do grupo S14 e; para IL-1 β , observamos que o grupo DTL diferiu positivamente do grupo S14; constatamos que o grupo DT reduziu significativamente a concentração sérica de IL-10 quando comparado ao grupo T14 e que os grupos DTL e S14 apresentaram tendência para redução deste parâmetro; já para as concentrações de IL-6, verificamos que o grupo T14 foi significativamente superior aos grupos DT, DTL e S14 ($p =$

6. Resultados

0,004) (**Figura 20**). Verificamos ainda que os animais do grupo DT diferiram significativamente dos demais grupos quando avaliamos a razão IL-10/TNF- α ($p = 0,001$) e que ambos, DTL e S14 apresentaram tendência em redução deste parâmetro quando comparados ao grupo T14 (**Figura 21**).

Tabela 13. Concentrações séricas de adiponectina, leptina, TNF- α , IL-1 β e IL-10 referentes ao experimento II.

| | DT | DTL | T14 | S14 | <i>p</i> |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------|
| Adiponectina (ng/mL) | 30.730 \pm 26,23 | 26.610 \pm 14,96 | 23.370 \pm 25,79 | 26.630 \pm 22,33 | 0,195 |
| Leptina (ng/mL) | 24,85 \pm 3,02 ^a | 25,61 \pm 4,60 ^a | 7,32 \pm 1,21 ^b | 38,62 \pm 3,55 ^a | < 0,001 |
| TNFα (pg/mL) | 2,45 0,20 ^{ab} | 2,99 0,10 ^{ab} | 2,37 0,19 ^a | 3,41 0,34 ^b | 0,043 |
| IL-1β (pg/mL) | 1,40 \pm 0,04 ^{ab} | 3,55 \pm 0,60 ^a | 2,33 \pm 0,56 ^{ab} | 1,38 \pm 0,02 ^b | 0,036 |
| IL-10 (pg/mL) | 5,67 \pm 0,576 ^a | 25,91 \pm 12,34 ^{ab} | 47,91 \pm 5,31 ^b | 22,56 \pm 6,32 ^{ab} | 0,022 |

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

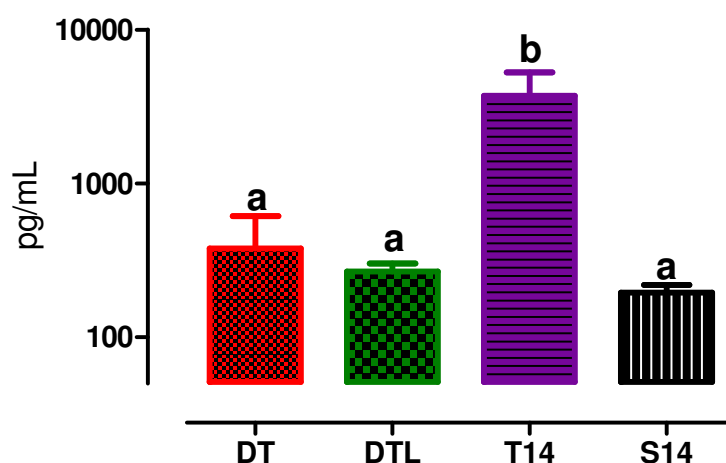


Figura 20. Concentração sérica de IL-6 referente aos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos.

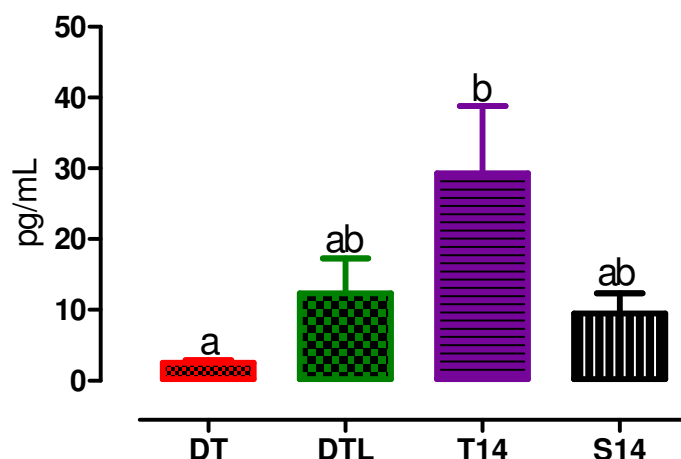


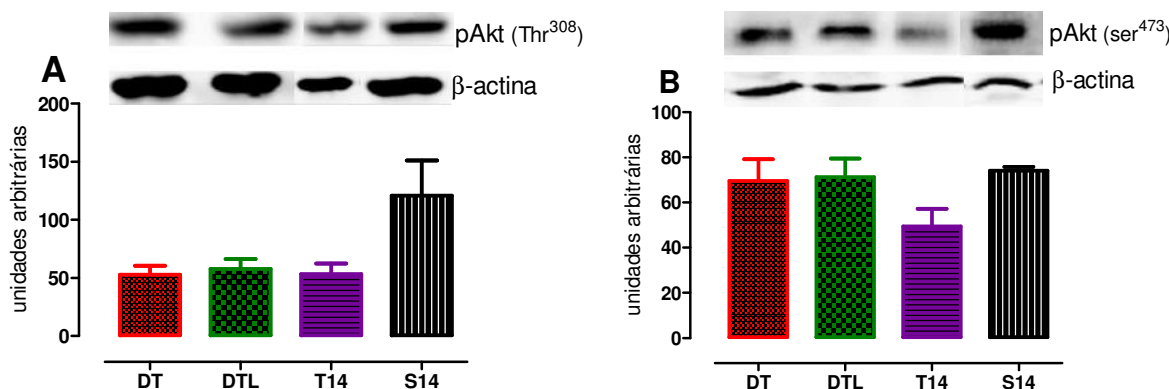
Figura 21. Razão IL-10/TNF- α referente aos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos.

6.2.11 Expressão proteica no tecido adiposo EPI

6.2.11.1 Expressão e fosforilação da proteína quinase Akt

Na figura 22, apresentamos os resultados de expressão proteica e de fosforilação no resíduo de treonina 308 e serina 473 da Akt referentes aos animais do experimento II, obtidos pela técnica de *Western Blotting*. Observamos que não houve diferença na fosforilação em treonina 308 ($p = 0,406$) (**Figura 22A**), em serina 473 ($p = 0,141$) (**Figura 22B**) e também na quantidade total ($p = 0,089$) (**Figura 22C**) entre todos os grupos experimentais.



6. Resultados

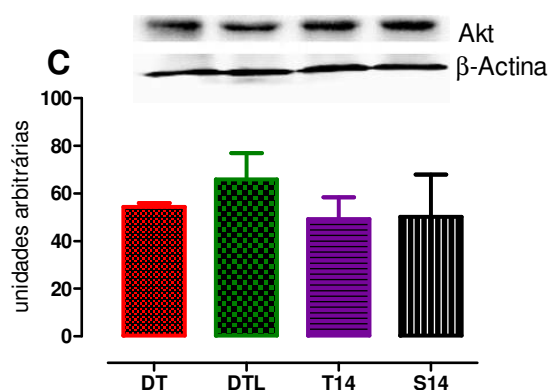


Figura 22. Expressão e fosforilação da Akt no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$).

6.2.11.2 Expressão e fosforilação da proteína quinase IRS1

Verificamos, na figura 23, que a fosforilação e a quantidade total da proteína quinase IRS1, obtida pela técnica de *Western Blotting*, não diferiu entre os grupos DT, DTL, T14 e S14 no experimento II ($p = 0,987$).

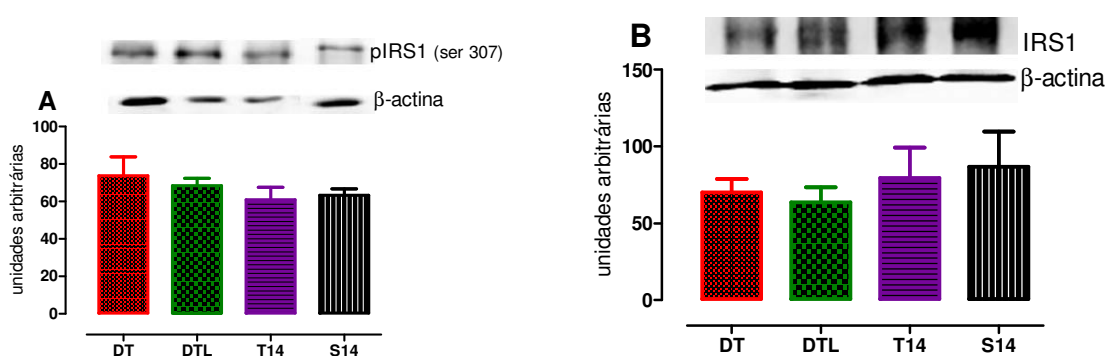


Figura 23. Expressão e fosforilação da IRS1 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$).

6.2.11.3 Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2

Na figura 24, podemos verificar que seis semanas de destreinamento físico não alteraram a fosforilação da proteína quinase JNK2 (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) entre os grupos DT, DTL e T14; contudo, entre estes e o grupo S14, houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,026$) (**Figura 24A**). Por outro lado, a quantidade total da JNK não apresentou diferença entre os grupos do experimento II ($p = 0,971$) (**Figura 24B**).

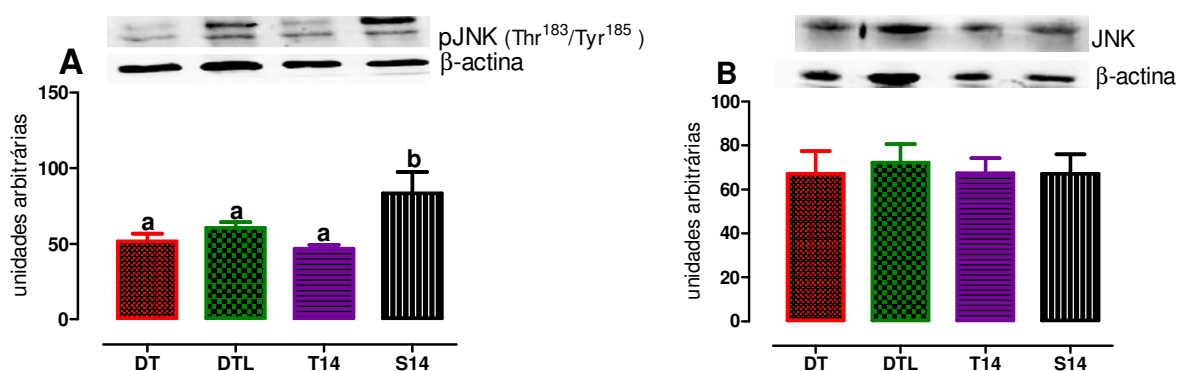


Figura 24. Expressão e fosforilação da proteína quinase JNK2 no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.11.4 Expressão e fosforilação da proteína quinase IKK

Verificamos, na figura 25, que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a proteína quinase IKK na forma fosforilada ($p = 0,123$) (**Figura 25A**) e na quantidade total ($p = 0,818$) (**Figura 25B**).

6. Resultados

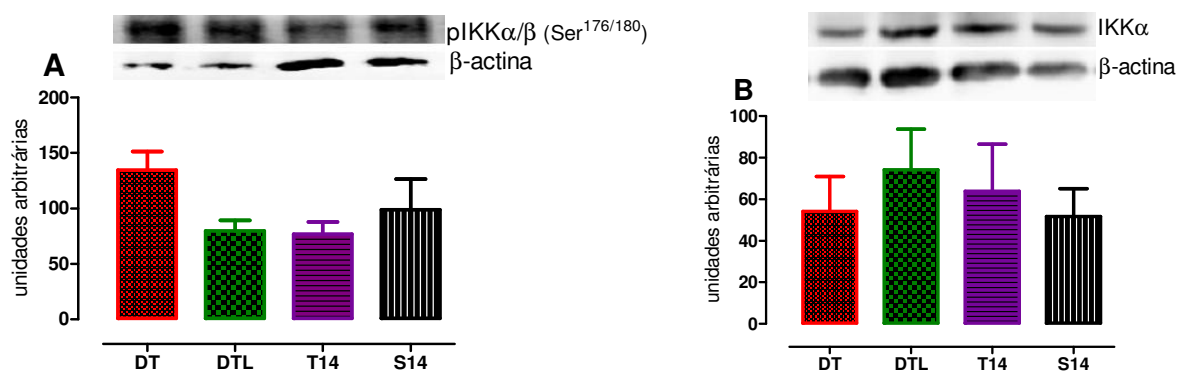


Figura 25. Expressão e fosforilação da proteína quinase IKK no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8).

6.2.11.5 Expressão e fosforilação da proteína quinase PKC θ

Na figura 26 estão apresentados os resultados referentes à proteína quinase PKC θ . Podemos verificar que, em relação à fosforilação da proteína, o grupo DT diferiu significativamente dos grupos DTL e T14 e apresentou média semelhante ao grupo S14 ($p = 0,011$) (**Figura 26A**). Para a quantidade total da proteína, não encontramos diferenças entre os grupos experimentais ($p = 0,868$) (**Figura 26B**).

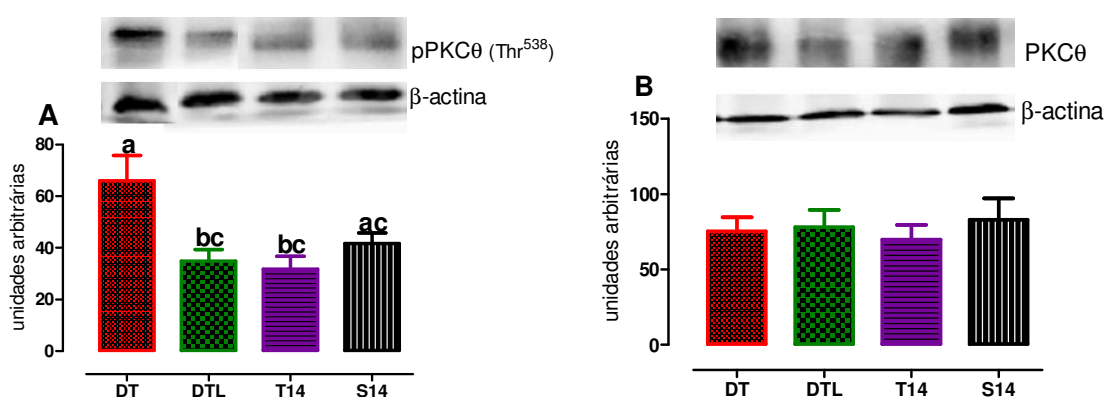


Figura 26. Expressão e fosforilação da proteína quinase PKC θ no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas (n = 8); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU (n = 7); T14: grupo treinado por quatorze semanas (n = 8); S14: grupo sedentário por quatorze semanas (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

6.2.11.6 Expressão e fosforilação da proteína quinase AMPK α

Na figura 27, apresentamos os resultados de expressão e fosforilação da proteína quinase AMPK α . Observamos que os animais do grupo DT apresentaram redução significativa na fosforilação desta proteína em relação aos demais grupos experimentais ($p = 0,039$) (**Figura 27A**); a forma total não diferiu significativamente entre os grupos ($p = 0,325$) (**Figura 27B**).

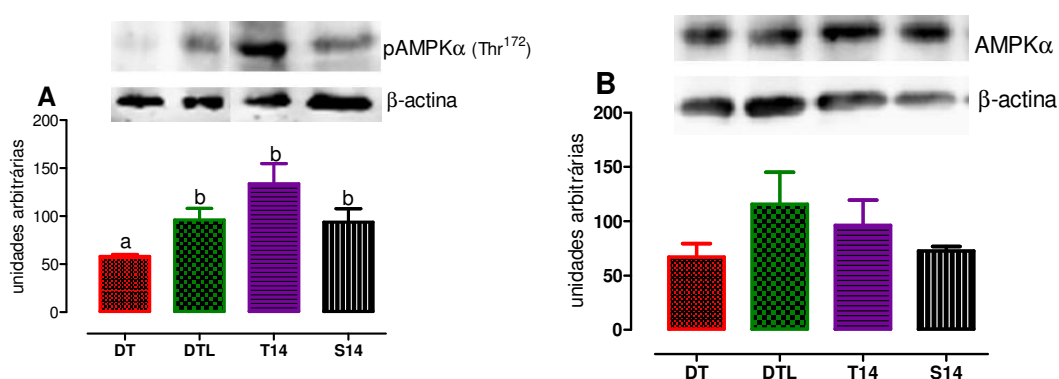


Figura 27. Expressão e fosforilação da proteína quinase AMPK α no tecido adiposo EPI dos animais do experimento II.

Dados expressos como média \pm erro padrão. DT: grupo destreinado por seis semanas ($n = 8$); DTL: grupo destreinado por seis semanas e com ração AIN93-M + LEU ($n = 7$); T14: grupo treinado por quatorze semanas ($n = 8$); S14: grupo sedentário por quatorze semanas ($n = 8$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

7. Discussão

O experimento I do presente trabalho foi elaborado com o objetivo de caracterizar o TF por 8 semanas, pois, apesar do protocolo adotado ser efetivo em aumentar o VO_2 máximo, a atividade máxima da enzima citrato sintase, além de parâmetros de rendimento físico demonstrados em diversas publicações científicas (NEGRÃO *et al.*, 1992; DUFLOTH *et al.*, 1997; BORGES-SILVA *et al.*, 2005; BORGES-SILVA *et al.*, 2007), alguns parâmetros que avaliamos, nas condições experimentais apresentadas, necessitavam de maiores comprovações.

Os resultados indicam que as 8 semanas do protocolo de TF reduziram a massa dos coxins adiposos, o percentual de gordura da carcaça, assim como o volume de adipócitos do tecido adiposo periepídidimal, além de proporcionar aumento da massa livre de gordura. Ademais, ficou demonstrado que este protocolo de TF reduziu as concentrações séricas de leptina e a fosforilação da proteína quinase JNK no tecido adiposo periepídidimal dos animais treinados.

Após a confirmação da efetividade do protocolo de TF, elaboramos o experimento II para verificarmos as alterações decorrentes do período de destreino físico e da suplementação crônica de LEU nesta condição. Para tanto, os animais foram submetidos ao TF por 8 semanas e, após este período, os grupos DT e DTL tiveram seu treinamento cessado por seis semanas enquanto o grupo T14 permaneceu treinando e o grupo S14 ficou inativo fisicamente até o final das 14 semanas do protocolo experimental.

Os resultados obtidos no experimento II indicam que a atividade máxima da enzima citrato sintase, frequentemente utilizada como marcador do efeito do TF no metabolismo energético, reduziu-se nos animais dos grupos DT e DTL a níveis similares àqueles do grupo S14. Em contrapartida, nos animais que permaneceram treinando durante todo o protocolo experimental, houve aumento significativo na atividade desta enzima. Portanto, comprovamos que seis semanas de destreino físico revertem o efeito induzido pelo TF neste parâmetro. Contraditoriamente, Laye *et al.* (2009) não encontram diferenças significativas na atividade desta enzima 5 e 173 horas após a suspensão da atividade física espontânea de ratos. Entretanto, ressaltamos que o tipo de exercício (roda) e o tempo de protocolo experimental diferiram do nosso estudo.

7. Discussão

Em humanos, Taivassalo *et al.* (2006), verificaram que após 14 semanas de interrupção do TF aeróbio houve redução na atividade oxidativa mitocondrial de pacientes previamente treinados por igual período. Por sua vez, alguns estudos que avaliaram a condição física dos indivíduos por meio de teste de VO₂ máximo encontraram redução deste parâmetro após o período de destreinamento físico (FATOUROS *et al.*, 2005; ST-AMAND *et al.*, 2011) ou não encontraram alterações (ROGERS *et al.*, 1990; PETIBOIS *et al.*, 2004). Destacamos que as variações destes parâmetros dependem do modo, da frequência, da intensidade e da duração do protocolo de exercício físico realizado bem como do tempo que os indivíduos permaneceram destreinados.

Após oito semanas de experimento os grupos que foram submetidos ao protocolo de TF (DT, DTL e T14) apresentaram evolução da massa corporal significativamente inferior à do grupo S14, apesar de não apresentarem variações significativas no consumo alimentar no mesmo período. Desta forma, verifica-se que o TF promoveu o balanço energético negativo sem desencadear um impulso homeostático para aumentar o consumo energético e reestabelecer a disponibilidade de energia. O exercício físico pode alterar o balanço energético por meio de diversos mecanismos, incluindo a energia gasta durante e logo após a realização da atividade física e por alterações no metabolismo de repouso (DONNELLY *et al.*, 2004). O TF induz adaptações no músculo esquelético que alteram a utilização do substrato energético e, desta forma, a oxidação de gordura durante o repouso é maior em indivíduos treinados independentemente da ingestão alimentar ou da composição corporal (CALLES-ESCANDON *et al.*, 1996). De maneira similar ao nosso estudo, Garekania *et al.* (2011) verificaram que a massa corporal dos animais exercitados foi inferior à do grupo sedentário após 12 semanas de um protocolo de TF, independentemente da intensidade de treino adotada. No experimento I do nosso estudo verificamos, por meio da avaliação da composição química da carcaça, que esta redução na massa corporal ocorreu por redução da adiposidade corporal, uma vez que a massa livre de gordura encontrava-se aumentada após as 8 semanas de TF.

Em ensaios clínicos randomizados, a manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo, seja com atividades físicas espontâneas ou com engajamento em programas de exercício físico, é eficaz na manutenção do peso corporal por representar o aumento no gasto energético diário em humanos (DONNELLY *et al.*, 2004). Entretanto, alguns estudos em que o exercício foi realizado sem restrição energética por mais de 12 meses não reportaram perda de massa corporal (DONNELLY *et al.*, 2000; DONNELLY *et al.*, 2003).

7. Discussão

Contudo, no nosso estudo, a interrupção do TF promoveu aumento da massa corporal dos animais em tal proporção que, ao final das 14 semanas de protocolo experimental, os animais dos grupos DT e DTL apresentaram resultado estatisticamente semelhante aqueles do grupo S14 que permaneceram fisicamente inativos durante todo o período do estudo. Ao verificarmos a variação da massa corporal apenas nas 6 semanas de destreino físico, constatamos que os grupos DT e DTL apresentaram, como esperado, uma evolução maior que o grupo T14 e, surpreendentemente, esta variação foi superior também em relação aos animais sedentários, uma vez que os animais dos grupos DT e DTL começaram o período de destreino físico com massa corporal inferior ao grupo S14 (~ 16,5 %). Este ganho de massa corporal acelerado já era descrito, desde a década de 1970, como uma das modificações que ocorrem quando ratos treinados são submetidos a período prolongado de destreino físico (BOOTH *et al.*, 1974; DOHM *et al.*, 1977). Por outro lado, Yasari *et al.* (2006) reportaram que após 2 semanas de destreino físico só houve diferença significativa na massa corporal dos animais que receberam dieta hiperlipídica; entretanto, 6 semanas após a interrupção do TF houve ganhos significativos independentemente da dieta consumida.

Como citado anteriormente, o consumo médio de ração nas primeiras 8 semanas do experimento II não diferiu significativamente entre os grupos. Contudo, nas 6 semanas de destreino físico verificamos que o grupo DT apresentou consumo alimentar 7,82 % menor que o grupo DTL e, respectivamente, 21,14 % e 19,14 % maior que os grupos T14 e S14. Quando fizemos esta análise semana a semana observamos que o período de destreino físico, de alguma maneira, representou um estímulo para que os animais aumentassem o consumo de ração e que, nas três semanas seguintes à cessação do TF, este fato foi mais acentuado, visto que nas demais semanas houve equiparação gradativa aos grupo T14 e S14.

Constatamos que o aumento no consumo de ração foi acompanhado de maior ganho de massa corporal naqueles animais que tiveram seus treinos interrompidos. Portanto, com a redução do gasto energético não houve, concomitantemente, redução na ingestão alimentar para promover um equilíbrio no balanço energético. Este achado corrobora os dados de Applegate *et al.* (1987) em que os ratos foram retirados do exercício físico por 2 semanas e a ingestão de alimentos, tanto dos animais controles quanto daqueles alimentados com dieta rica em gordura, aumentou cerca de 25% sobre os seus respectivos controles. Entretanto, em algumas pesquisas, o destreino físico não está associado ao maior consumo energético, demonstrando que a interrupção do TF promove

7. Discussão

aumento de massa e gordura corporais sem qualquer interferência de uma possível hiperfagia (LAMBERT *et al.*, 1994; YASARI *et al.*, 2006). Notamos ainda, no presente estudo, que a suplementação crônica de LEU não foi capaz de controlar o apetite nestas condições experimentais.

Contraditoriamente, as evidências disponíveis na literatura científica indicam que a fosforilação da mTOR exerce efeitos anorexígenos nos mecanismos centrais de controle do apetite (COTA *et al.*, 2006) e que tanto a administração intracerebroventricular quanto a suplementação de leucina são capazes de ativar estes mecanismos em regiões específicas do hipotálamo (COTA *et al.*, 2006; ROPELLE *et al.*, 2008). Neste contexto, poder-se-ia imaginar que o conteúdo de leucina acrescentado à ração AIN93-M não tivesse sido significativo, contudo, os dados do aminograma indicam que houve, de fato, acréscimo de 5,1 % em relação à ração controle e, ainda, os dados do consumo indicam que não houve rejeição da ração suplementada por parte dos animais, ao contrario, na 1ª semana de destreinamento físico houve consumo superior aos demais grupos. Entretanto, quando analisamos as concentrações séricas dos aminoácidos, verificamos que o teor de aminoácidos de cadeia ramificada, inclusive de leucina, não diferiu entre os grupos experimentais.

No contexto descrito acima, a biodisponibilidade da leucina pode ter sido prejudicada pelas condições experimentais deste estudo. Todavia, acreditamos que o fato dos animais terem sido eutanasiados em jejum de 8 horas possa ser o motivo principal que justifique a concentração de leucina igual entre os grupos. Desta forma, novos estudos devem avaliar também as concentrações dos metabólitos da leucina circulantes e a presença destes em tecidos periféricos, sobretudo no músculo esquelético no qual ocorre primariamente a transaminação dos aminoácidos de cadeia ramificada. Corroborando este raciocínio, Miralles-Arnau *et al.* (2011) verificaram que a administração enteral de leucina em ratos *wistar*, com 8 a 9 semanas de idade, aumenta as concentrações plasmáticas deste aminoácido, mas que após 8 h de jejum estes níveis retornaram aos valores basais.

Em relação à adiposidade corporal, os animais dos grupos DT e DTL apresentaram maior massa dos coxins adiposos avaliados e maior percentual de gordura da carcaça, independentemente da dieta consumida, em relação ao grupo T14 e equiparando-se ao grupo S14 excetuando-se a massa do tecido adiposo retroperitoneal, que permaneceu menor nos animais destreinados em relação àqueles sedentários. Verificamos, ainda, que os animais do grupo DT e DTL apresentaram redução da massa livre de gordura,

7. Discussão

considerando que no experimento I o protocolo de TF provocou aumento deste parâmetro após 8 semanas de experimento. Neste sentido, evidências apontam que o destreino físico resulta em rápido ganho de gordura corporal e interação positiva com dietas hiperlipídicas, ou seja, quando a condição de destreino é associada ao consumo de dietas com alto teor de gordura saturada, o aumento na adiposidade é potencializado (YASARI *et al.*, 2006, 2007).

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 contrapartida, as evidências experimentais destacam que o TF reduz o tamanho dos adipócitos, levando à diminuição na massa do tecido adiposo (MIYAZAKI *et al.*, 2010; GLEESON *et al.*, 2011). Neste sentido, estudo recente do nosso laboratório mostrou que a natação por 6 semanas reduziu significativamente a adiposidade corporal de ratos previamente alimentados com dieta hiperlipídica (TORRES-LEAL *et al.*, 2011).

Inversamente, as pesquisas têm relatado, há muito tempo, que o destreino físico promove rápido aumento da massa adiposa em ratos (DOHM *et al.*, 1977; CRAIG, THOMPSON e HOLLOSZY, 1983; APPLGATE e STERN, 1987; LAMBERT *et al.*, 1994) e alguns estudos indicam que esta condição pode constituir um estímulo para o desenvolvimento da obesidade, especialmente se combinada com dietas hiperlipídicas (SHEPARD *et al.*, 2001; PETIBOIS *et al.*, 2004). O destreino físico pode provocar aumento da atividade de enzimas lipogênicas envolvidas na síntese de ácidos graxos e lipogênese no TAB (APPLGATE e STERN, 1987; LAMBERT *et al.*, 1994). Craig *et al.* (1991) reportaram aumento do diâmetro de adipócitos de ratas após 7 e 14 dias de destreino físico e que, após 21 dias de inatividade física o tamanho destes retornou para o diâmetro do sétimo dia. No presente estudo, o destreino físico induziu aumento no volume de adipócitos isolados do tecido adiposo periepididimal, equiparando os grupos DT e S14; contudo, a suplementação crônica de leucina não permitiu que os animais do grupo DTL apresentassem o mesmo grau de hipertrofia daqueles que permaneceram sedentários por 14 semanas, assim como foi capaz de manter o volume de adipócitos estatisticamente semelhante ao grupo T14.

Em roedores alimentados com dieta hiperlipídica, a suplementação de leucina induz marcante redução no ganho de massa corporal comparado à dieta não suplementada,

resultado de diminuição da gordura corporal sem mudanças na massa livre de gordura (ZHANG *et al.*, 2007) e estes efeitos têm sido explicados pela diminuição da ingestão ou pelo aumento no gasto energético (ZHANG *et al.*, 2007; NEWGARD *et al.*, 2009). Estudo realizado em nosso laboratório indicou que a suplementação crônica de leucina aumentou a perda de gordura corporal, preservando a massa livre de gordura de ratos submetidos à restrição alimentar (DONATO JR. *et al.*, 2005). Em humanos, as dietas crônicas com moderado a alto teor proteico resultam em aumento de massa corporal com perda de gordura minimizando a perda de massa magra em comparação com dietas de baixo teor de carboidratos em adultos obesos (KRIEGER *et al.*, 2006). Entretanto, não encontramos estudos de ensaios clínicos crônicos com suplementação de leucina isolada ou ACR.

Reconhecidamente, o TAB desempenha papel crucial na homeostase energética, na sensibilidade à insulina e no metabolismo de carboidratos e lipídios. Estas ações são mediadas por diversos mecanismos categorizados como endócrinos e não endócrinos (HAVEL, 2004; ROSEN e SPIEGELMAN, 2006). O tecido adiposo visceral libera uma grande quantidade de ácidos graxos livres e adipocinas na veia porta que serão depositados diretamente no fígado e o aumento na deposição destes pode interferir na homeostase glicêmica (GIRARD e LAFONTAN, 2008).

Em relação à concentração sérica dos ácidos não esterificados, observamos que as condições experimentais a que foram submetidos os animais no presente estudo não alteraram os níveis circulantes deste parâmetro avaliado. Esta constatação é similar a apresentada por Laye *et al.* (2008), que não encontraram diferenças significativas nas concentrações séricas dos ácidos graxos livres após 5 e 173 horas de interrupção da atividade física espontânea. Em atletas de *endurance* submetidos a uma semana de destreinamento físico, Gill *et al.* (2003) verificaram que as concentrações séricas dos ácidos graxos não esterificados reduziram 50 % quando comparados ao período de TF. Segundo os autores, a maior concentração de ácidos graxos não esterificados durante o TF provavelmente reflete a combinação do aumento na liberação de ácidos graxos contidos nas lipoproteínas, a partir da ação da lipase de lipoproteínas, e aumento da liberação de ácidos graxos, a partir de adipócitos mediada pela lipase sensível a hormônios. 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 que, em última instância provoca resistência à ação da insulina em tecidos periféricos (DELARUE e MAGNAN, 2007).

7. Discussão

No nosso estudo, observamos que as variações na glicemia de jejum ocorreram dentro de uma faixa de normalidade entre todos os grupos experimentais. Em relação à área sob a curva, os animais que foram submetidos ao TF apresentam redução significativa em comparação àqueles que permaneceram sedentários. O TF aumenta a tolerância à glicose e aumenta a sensibilidade à insulina em resposta à sobrecarga oral de glicose (SEALS *et al.*, 1984). A eliminação de uma sobrecarga oral de glicose é regulada principalmente pelas ações da insulina aumentando a translocação dos transportadores de glicose intracelulares e aumentando o fluxo sanguíneo no músculo esquelético (KATZ *et al.*, 1983; RODNICK *et al.*, 1992; BARON e BRECTHEL, 1993). Por outro lado, o destreino físico pode reduzir a tolerância à glicose e à ação da insulina (KING *et al.*, 1988; HAMBURG *et al.*, 2007), associadas à redução do GLUT4 no músculo esquelético (VUKOVICH *et al.*, 1996; ARCIERO *et al.*, 1998). Craig *et al.* (1991) verificaram que a captação e a oxidação de glicose em adipócitos isolados de ratos permaneceu elavada por 7 dias e declinou aos 14 e 21 dias após o destreino físico. Por outro lado, Lehnen *et al.* (2010) mostram que, apesar da reversão na expressão de GLUT4 no músculo esquelético e no TAB, os benefícios metabólicos do TF foram preservados com 2 semanas de treino. Nossos resultados corroboram os deste estudo e também indicam preservação dos benefícios do TF após seis semanas de destreino físico; contudo, o grupo DTL também apresentou resultado estatisticamente semelhante ao grupo S14, demonstrando que a suplementação de leucina não melhorou a tolerância à glicose.

Estudos prévios têm demonstrado que a leucina participa da regulação da homeostase glicêmica (LAYMAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007). O metabolismo dos ACR no músculo esquelético está relacionado à síntese de alanina, a qual é liberada do tecido muscular, entra na corrente sanguínea e é extraída pelo fígado, participando, então, da gliconeogênese hepática, sobretudo em condições catabólicas (LAYMAN *et al.*, 2003). Contudo, estudo recente do nosso laboratório mostrou que os níveis séricos de glicose não foram alterados com a suplementação de leucina em ratos previamente alimentados com dieta hiperlipídica (TORRES-LEAL *et al.*, 2011).

Os dados do teste de tolerância à insulina mostram que tanto o destreino físico quanto a suplementação de leucina não alteraram a sensibilidade a este hormônio, uma vez que não houve diferença entre os grupos experimentais. Os nossos resultados corroboram os de Lehnen *et al.* (2010), que reportam que, após 2 semanas de destreino físico, os animais não apresentaram diferenças na taxa de decaimento da glicose após administração de insulina.

7. Discussão

Os resultados do volume de adipócitos, TOTG, TTI_{ip} e ácidos graxos não esterificados nos permitem supor que a capacidade do TAB de estocar triacilgliceróis tenha sido preservada, uma vez que a captação de glicose não foi prejudicada após 6 semanas de destreino físico.

Contudo, a maior deposição de triacilgliceróis nas gotículas de lipídios leva à hipertrofia dos adipócitos, podendo acarretar maior produção e liberação de adipocinas caracterizando a condição pró-inflamatória (FERRANTI e MOZAFFARIAN, 2008). Nesta perspectiva, verificamos que o destreino físico provocou alteração do balanço de adipocinas pró e anti-inflamatórias. Desta forma, o destreino físico por 6 semanas reverteu a redução nas concentrações séricas de leptina que haviam sido demonstradas no experimento I, uma vez que os grupos DT e DTL apresentaram valores estatisticamente similares ao grupo S14 e maiores que o grupo T14. Os mecanismos pelos quais as mudanças induzidas pelo TF influenciam as concentrações de adipocinas permanecem obscuros, mas as evidências experimentais adquiridas 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 o aumento no volume de adipócitos ocorrido nos animais dos grupos DT e DTL justifique as maiores concentrações séricas de leptina entre estes animais.

Alguns estudos indicam que a leucina é capaz de regular a síntese proteica no tecido adiposo, assim como a síntese e a secreção *in vitro* de leptina (LYNCH, 2001; LYNCH *et al.*, 2002; ROH *et al.*, 2002; LYNCH *et al.*, 2003). Neste sentido, poder-se-ia especular que os animais do grupo DTL apresentariam concentração sérica de leptina maior que os demais animais que receberam ração controle e que isso poderia promover alterações no balanço energético visto que a leptina estimula o gasto energético e reduz a ingestão alimentar (OSWAL e YEO, 2010). Contudo, conforme pudemos verificar, os animais do grupo DTL apresentaram tanto consumo de ração quanto adiposidade corporal elevados. Resultados do nosso laboratório também indicam a correlação direta das concentrações séricas de leptina com a quantidade de gordura corporal, sem efeito da suplementação crônica de leucina (DONATO Jr. *et al.*, 2006; TORRES-LEAL *et al.*, 2011). Gutin *et al.* (1999) constataram que as concentrações séricas de leptina foram reduzidas significativamente em crianças obesas submetidas a um protocolo de TF durante 4 meses e aumentaram acentuadamente após igual período de cessação do TF independentemente das alterações na composição corporal.

Além das ações anorexígenas da leptina, os estudos têm demonstrado que seus níveis circulantes aumentam durante processos infecciosos e inflamatórios sugerindo que este hormônio é parte da resposta imune e dos mecanismos de defesa do hospedeiro (FAGGIONI, FEINGOLD e GRUNFELD, 2001; OTERO *et al.*, 2005). Adicionalmente, evidências recentes mostram que diferentes estímulos inflamatórios regulam a expressão do RNAm e os níveis circulantes da leptina conferindo-lhe ação de uma adipocina pró-inflamatória (FAGGIONI, FEINGOLD e GRUNFELD, 2001). Woo *et al.* (2011) reportaram que o TF contínuo por 24 semanas reduziu os níveis circulantes de leptina de crianças obesas e que o grupo que teve o TF interrompido com 12 semanas não apresentou esta redução. Dessa forma, as concentrações séricas elevadas de leptina no presente estudo revelam que o efeito anti-inflamatório do TF foi revertido em 6 semanas de destreino físico.

Por outro lado, os estudos que investigam os efeitos do TF nas concentrações de adiponectina permanecem inconsistentes tanto em humanos (SIMPSON e SINGH, 2008) quanto em animais experimentais (KIMURA *et al.*, 2006; de LEMOS *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 2007), mas as concentrações de adiponectina relacionam-se inversamente com o tamanho dos adipócitos (SKURK *et al.*, 2007). Moghadasi *et al.* (2011) verificaram que a glicemia de jejum, a concentração de insulina e a resistência à insulina foram reduzidas após o TF e atribuíram estes resultados ao aumento nas concentrações de adiponectina, que permaneceram elevadas após 1 semana de destreino físico. Por sua vez, Yatagai *et al.* (2003) demonstraram que a adiponectina e a sensibilidade à insulina plasmática diminuíram e aumentaram, respectivamente, após 6 semanas de treinamento de *endurance* e ambos voltaram para os níveis basais uma semana após a cessação do TF. Em idosos com sobrepeso, as concentrações séricas de adiponectina aumentaram após 24 semanas de treinamento resistido de intensidades moderada e alta e, após período equivalente de destreino físico, os valores foram reduzidos apenas no grupo que havia treinado em intensidade moderada (FATOUROS *et al.*, 2005). No nosso estudo não encontramos diferenças nas concentrações séricas desta adipocina entre todos os grupos experimentais. Diferentemente, estudo conduzido por Torres-Leal *et al.* (2011) em nosso laboratório mostrou que a suplementação de 5 % de leucina por 6 semanas aumentou significativamente a concentração sérica de adiponectina em ratos previamente alimentados com dieta hiperlipídica.

Os dados disponíveis na literatura a respeito das alterações promovidas pelo TF nas concentrações de IL1- β são contraditórios e inconclusivos, visto que alguns verificaram

7. Discussão

que, após uma sessão aguda de exercício físico, há elevação nas concentrações séricas, assim como no meio de cultura de células tratadas com LPS (lipopolissacarídeo) (GIRALDO *et al.*, 2008; MARTIN-CORDERO *et al.*, 2009). Os macrófagos são a principal fonte de produção de IL-1 β , que é um indicativo da capacidade funcional destas células como elo entre a resposta imune inata e/ou inflamatória e a resposta imune adaptativa (MARTIN-CORDERO *et al.*, 2009). Em trabalho publicado recentemente, a suplementação de leucina reduziu o aparecimento de macrófagos infiltrados no tecido adiposo e reduziu os níveis de TNF- α e F4/80 (um marcador de macrófagos) em 40-45 % de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (MACOTELO *et al.*, 2011). Contraditoriamente, no presente estudo constatamos que a concentração sérica de IL-1 β foi superior no grupo DTL em comparação ao grupo S14, embora não tenha diferido dos demais grupos, indicando que a suplementação crônica de leucina associada à condição de destreinamento físico representa um estímulo para a produção desta citocina.

Os resultados indicam ainda que o período de destreinamento físico elevou as concentrações séricas de TNF- α sem, contudo, diferenciar os animais dos grupos DT e DTL daqueles do grupo T14. Por sua vez, constatamos que os níveis circulantes de IL-10 reduziram-se significativamente nos animais do grupo DT, quando comparados ao grupo T14, e que os animais dos grupos DTL e S14 apresentaram resultados intermediários entre os grupos experimentais. Os adipócitos podem produzir concentrações elevadas tanto de TNF- α quanto de IL-10 e estas flutuações dependem essencialmente do estímulo recebido (LIRA *et al.*, 2008). O TF reduz os marcadores de inflamação, modulando o tecido adiposo visceral, e conseqüentemente, diminuindo a produção de adipocinas e também alterando a liberação de citocinas do músculo esquelético, das células endoteliais, e do sistema imunológico (RIBEIRO *et al.*, 2010; HOPPS *et al.*, 2011). Desta forma, os resultados do nosso estudo indicam que a interrupção repentina do TF representou provocou uma condição pró-inflamatória, sobretudo quando avaliamos a razão IL-10/TNF α , e que a suplementação de leucina não foi suficientemente efetiva para impedir esta condição.

No presente estudo, as concentrações séricas de IL-6 nos grupos DT, DTL e S14 foram aproximadamente 100 vezes inferiores às concentrações do grupo T14. Esse resultado inicialmente parece paradoxal, visto que a IL-6 é frequentemente descrita como uma adipocina pró-inflamatória envolvida em diversas patologias caracterizadas pela inflamação sistêmica e de baixa intensidade (CAREY e FEBBRAIO, 2004; KUSMINSKI *et al.*, 2007; SIMONS *et al.*, 2007). Contudo, diversas evidências científicas indicam que, durante a realização do exercício físico, a produção e a liberação de IL-6 a partir do músculo

7. Discussão

esquelético, aumenta em até 100 vezes (KELLER *et al.*, 2001; PEDERSEN *et al.*, 2001; STEENBERG *et al.*, 2002; PEDERSEN, 2011). Os estudos indicam que a IL-6 produzida e liberada pelo músculo esquelético (aqui denominada miocina) tem ação autócrina, por meio da ativação da AMPK e/ou da PI-3K, por aumentar a captação de glicose, a oxidação de lipídios e ação endócrina, aumentando a produção hepática de glicose ou a lipólise no tecido adiposo durante o exercício físico. As maiores concentrações circulantes de IL-6 são acompanhadas pelo aparecimento de IL-1ra, de TNF-R e de IL-10 que exercem ação anti-inflamatória (PEDERSEN e FEBBRAIO, 2008). Portanto, a análise dos resultados do presente estudo em sua totalidade, nos permite inferir que a maior concentração de IL-6 encontrada seja originada do músculo esquelético.

A partir dos resultados discutidos anteriormente, inferimos que as condições experimentais a que foram submetidos os animais no presente estudo modularam o TAB, alterando a sua morfologia bem como o seu papel como órgão secretor de adipocinas e mediadores lipídicos. Apesar do entendimento crescente do efeito anti-inflamatório do TF, os mecanismos exatos pelos quais estes efeitos ocorrem não estão totalmente compreendidos e, menos ainda, as alterações intracelulares que o destreinamento físico pode proporcionar. Em razão disso, analisamos a expressão e a fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, inflamação e metabolismo oxidativo no TAB periepididimal.

Os efeitos da suplementação de leucina sobre as proteínas envolvidas na sinalização intracelular da insulina são contraditórios nas publicações científicas. Os ACR, especialmente leucina, podem ativar a mTOR, levando à fosforilação da proteína quinase p70S6 e aumentando a fosforilação no resíduo de serina 307 do IRS1 que, por sua vez, reduz a sinalização e a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo (PATTI *et al.*, 1998; TREMBLAY e MARETTE, 2001; TAKANO *et al.*, 2001; NEWGARD *et al.*, 2009). Por outro lado, a leucina restaura a sinalização de insulina em explantes de tecido adiposo de camundongos resistentes à ação deste hormônio (HINAULT *et al.*, 2004) e melhora a tolerância à glicose em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (MACOTELO *et al.*, 2011). Vale ressaltar que os estudos *in vivo* e *in vitro* apresentam diferenças pelo fato de que nos estudos *in vivo* os efeitos da leucina em um tecido podem afetar outros tecidos e, portanto, a homeostase metabólica sistêmica. Os resultados do nosso estudo indicam que as condições experimentais a que foram submetidos os animais não exerceram efeitos sobre a fosforilação da Akt nos resíduos de treonina 308 e serina 473 e do IRS1 no resíduo de serina 307, assim como sobre as quantidades totais destas proteínas. Estes resultados são condizentes com aqueles

7. Discussão

encontrados a partir dos testes de TOTG e TTI_{ip} que demonstram não haver prejuízo na captação de glicose estimulada por insulina.

Por sua vez, mudanças na estrutura, na função e na distribuição do TAB podem gerar ciclos viciosos, promovendo ainda mais alterações no próprio TAB e potencializando a condição pró-inflamatória. Neste sentido, investigamos proteínas que respondem e participam de processos inflamatórios intracelulares. Ressaltamos que não encontramos publicações que tenham investigado estas proteínas na condição de destreino físico e associada à suplementação com leucina; por esta razão, não há paralelo de comparação com os resultados do presente estudo; entretanto, tentaremos traçar um paralelismo com condições metabólicas de inflamação sistêmica de baixa intensidade.

Verificamos que seis semanas de destreino físico preservaram a redução na fosforilação da proteína JNK que havíamos constatado no tecido adiposo periepididimal dos animais do grupo T8 no experimento I, independentemente da dieta consumida em comparação com os animais do grupo S14. Estudos *in vitro* e em modelos animais fornecem fortes evidências de que a ativação da JNK é central para o desenvolvimento de complicações metabólicas induzidas pela obesidade (HIROSUMI *et al.*, 2002). As pesquisas com modelos animais assinalam evidências inequívocas do papel direto desta proteína no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina (VALLERIE *et al.*, 2011). A adição de adipocinas pró-inflamatórias ou de ácidos graxos livres no meio de cultura de adipócitos ou a indução de estresse oxidativo para promover resistência à ação da insulina requer a ativação da JNK, enquanto a supressão desta proteína restaura a captação de glicose estimulada por insulina e as vias de sinalização envolvidas neste processo (LEE *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2009). Luz *et al.* (2011) verificaram que o TF reduziu a fosforilação da JNK no tecido adiposo periepididimal e aumentou a sensibilidade à insulina de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

Recentemente, tornou-se evidente que a redução na atividade da JNK ou da IKK melhora a sinalização da insulina em modelos de obesidade em ratos e a intolerância à glicose induzida por lipídios (HIROSUMI *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2001). Neste sentido, Yaspelkis *et al.* (2010) constataram que a fosforilação da IKK reduziu-se no tecido muscular de ratos exercitados alimentados com dieta hiperlipídica. Os nossos resultados mostram que apesar do grupo DT apresentar valor médio superior aos demais grupos, não houve diferença significativa tanto para a fosforilação quanto para a quantidade total da proteína IKK α .

O IRS1 possui diversos resíduos potenciais para fosforilação em serina e tem sido hipotetizado que a ativação da proteína quinase PKC θ pode estimular a fosforilação da JNK e da IKK β e, indiretamente, fosforilar o resíduo 307 do IRS1 ou inibir a sinalização da insulina diretamente por meio da fosforilação do IRS1 em serina 1101 (ALTMAN, ISAKOV e BAIER, 2000; YU *et al.*, 2002; GREENE *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004). Quando avaliamos a fosforilação desta proteína, verificamos que o destreinamento físico promoveu maior fosforilação no grupo DT em relação aos grupos DTL e T14 e foi estatisticamente similar ao grupo S14. Interessantemente, a suplementação de leucina inibiu a fosforilação desta proteína no tecido adiposo periepididimal; contudo, os mecanismos pelos quais isto ocorreu ainda não são conhecidos.

Após constatarmos que o destreinamento físico está associado com mudanças no balanço energético que favorecem rápido aumento no tecido adiposo, resolvemos analisar a proteína AMPK α e constatamos que houve redução significativa na fosforilação do resíduo de treonina 172 no grupo DT, em relação aos demais grupos; verificamos ainda que a suplementação de leucina impediu a redução significativa na ativação desta proteína. Surpreendentemente, seis semanas de destreinamento físico, sem alteração na composição da dieta consumida, representaram estímulo suficiente para que os animais do grupo DT apresentassem redução na fosforilação da AMPK α , inclusive em relação aos animais que permaneceram sedentários durante todo o período experimental. Em contraste com o músculo esquelético e o fígado, o papel da AMPK no TAB tem recebido pouca atenção. Park *et al.* (2002) afirmaram que a maior ativação desta proteína no tecido adiposo periepididimal resulta em maior oxidação de ácidos graxos e redução na síntese de triacilglicerol. Mais recentemente, Takekoshi *et al.* (2006) demonstraram que o TF induz aumento significativo na fosforilação de AMPK α no tecido adiposo visceral e não no subcutâneo demonstrando que o efeito do TF foi dependente da localização do TAB. Neste sentido, os resultados do presente estudo nos permitem supor que a oxidação de ácidos graxos foi reduzida no tecido adiposo periepididimal dos animais que foram submetidos ao período de 6 semanas de destreinamento físico.

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- O destreinamento físico promove aumento da ingestão de ração.
- O destreinamento físico favorece o rápido ganho de massa corporal e concomitante aumento da adiposidade.
- O destreinamento físico representa uma condição pró-inflamatória.
- O destreinamento físico exerce modulação sobre o tecido adiposo periepídidimo alterando a atividade de algumas proteínas intracelulares.
- A suplementação crônica de leucina não consegue impedir as alterações promovidas pelo destreinamento físico.
- O sedentarismo *per se* representa uma condição pró-inflamatória.
- O TF, se continuado, exerce ação anti-inflamatória modulando, o tecido adiposo periepídidimo.

Baseados nestes achados, sugerimos que novos estudos sobre o tema analisem outros tecidos e/ou órgãos, além de outros coxins adiposos. Também devem ser analisados: os mecanismos centrais envolvidos no comportamento alimentar; as estratégias de redução parcial do TF; os diferentes tempos de destreinamento físico; as modificações na composição dos macronutrientes e a restrição alimentar, entre outras possibilidades.

9. REFERÊNCIAS

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.

ALTMAN, A.; ISAKOV, N.; BAIER, G. Protein kinase C θ : a new essential superstar on the T-cell stage. **Immunol Today**, v. 21, n. 11, p. 567-73, 2000.

ANTHONY, J. C. et al. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 928-36, 2002.

APPLEGATE, E. A.; UPTON, D. E.; STERN, J. S. Exercise and detraining: effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made obese by a high fat diet. **J Nutr**, v. 114, n. 2, p. 447-59, 1984.

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

BARON, A. D.; BRECHTEL, G. Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. **Am J Physiol**, v. 265, n. 1 Pt 1, p. E61-7, 1993.

BERMAN, D. M. et al. Predictors of adipose tissue lipoprotein lipase in middle-aged and older men: relationship to leptin and obesity, but not cardiovascular fitness. **Metabolism**, v. 48, n. 2, p. 183-9, 1999.

BIRNBAUM, M. J. Diabetes. Dialogue between muscle and fat. **Nature**, v. 409, n. 6821, p. 672-3, 2001.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, 1989.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 1, p. 3-30, 2002.

BOOTH, M. A.; BOOTH, M. J.; TAYLOR, A. W. Rat fat cell size and number with exercise training, detraining and weight loss. **Fed Proc**, v. 33, n. 8, p. 1959-63, 1974.

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

BORGES-SILVA, C. N. et al. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. **J Pineal Res**, v. 43, n. 1, p. 96-103, 2007.

BUSE, M. G.; REID, S. S. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. **J Clin Invest**, v. 56, n. 5, p. 1250-61, 1975.

CALLES-ESCANDON, J. et al. Exercise increases fat oxidation at rest unrelated to changes in energy balance or lipolysis. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6 Pt 1, p. E1009-14, 1996.

9. Referências

CAREY, A. L.; FEBBRAIO, M. A. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? **Diabetologia**, v. 47, n. 7, p. 1135-42, 2004.

CHEN, S. Y. et al. Effect of 2-month detraining on body composition and insulin sensitivity in young female dancers. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, n. 1, p. 40-4, 2006.

COTA, D. et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 927-30, 2006.

CRAIG, B. W.; THOMPSON, K.; HOLLOSZY, J. O. Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. **J Appl Physiol**, v. 54, n. 2, p. 571-5, 1983.

CUSI, K. et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J Clin Invest**, v. 105, n. 3, p. 311-20, 2000.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**, 2011.

DAAR, A. S. et al. Grand challenges in chronic non-communicable diseases. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 494-6, 2007.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clin Chem**, v. 54, n. 6, p. 945-55, 2008.

DE LEMOS, E. T. et al. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 8, p. BR168-74, 2007.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 2, p. 142-8, 2007.

DEMPSEY, P. W. et al. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 3-4, p. 193-209, 2003.

DEVKOTA, S.; LAYMAN, D. K. Protein metabolic roles in treatment of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 4, p. 403-7, 2010.

DI GIROLAMO, M.; MENDLINGER, S.; FERTIG, J. W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am J Physiol**, v. 221, n. 3, p. 850-8, 1971.

DOHM, G. L. et al. Changes in body fat and lipogenic enzyme activities in rats after termination of exercise training. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 155, n. 2, p. 157-9, 1977.

DONATO, J., JR. et al. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition**, v. 22, n. 5, p. 520-7, 2006.

DONATO, J., JR. et al. Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adult rats. **Life Sci**, v. 81, n. 1, p. 31-9, 2007.

DUFLOTH, D. L.; MORRIS, M.; MICHELINI, L. C. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 2, p. R1271-82, 1997.

9. Referências

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2565-71, 2001.

FARNSWORTH, E. et al. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 1, p. 31-9, 2003.

FATOUROS, I. G. et al. Leptin and adiponectin responses in overweight inactive elderly following resistance training and detraining are intensity related. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 11, p. 5970-7, 2005.

FERRARA, C. M. et al. Short-term exercise enhances insulin-stimulated GLUT-4 translocation and glucose transport in adipose cells. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 6, p. 2106-11, 1998.

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

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, 2007.

FROSIG, C. et al. 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. 2093-102, 2007.

FULKS, R. M.; LI, J. B.; GOLDBERG, A. L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. **J Biol Chem**, v. 250, n. 1, p. 290-8, 1975.

GAO, Z. et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J Biol Chem**, v. 277, n. 50, p. 48115-21, 2002.

GILL, J. M. et al. Effects of short-term detraining on postprandial metabolism, endothelial function, and inflammation in endurance-trained men: dissociation between changes in triglyceride metabolism and endothelial function. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 9, p. 4328-35, 2003.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 9, p. 607-15, 2011.

GOLLISCH, K. S. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 2, p. E495-504, 2009.

GONZALEZ-PERIZ, A.; CLARIA, J. Resolution of adipose tissue inflammation. **ScientificWorldJournal**, v. 10, p. 832-56, 2010.

GREENE, M. W. et al. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. **Biochem J**, v. 378, n. Pt 1, p. 105-16, 2004.

GUTIN, B. et al. Plasma leptin concentrations in obese children: changes during 4-mo periods with and without physical training. **Am J Clin Nutr**, v. 69, n. 3, p. 388-94, 1999.

HAMBURG, N. M. et al. Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 12, p. 2650-6, 2007.

9. Referências

HARIRI, A. R. Genetic polymorphisms: a cornerstone of translational biobehavioral research. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 18, p. 18ps6, 2010.

HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1423-34, 2007.

HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S143-51, 2004.

HERMAN, M. A. et al. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. **J Biol Chem**, v. 285, n. 15, p. 11348-56, 2010.

HINAULT, C. et al. Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from db/db mice. **FASEB J**, v. 18, n. 15, p. 1894-6, 2004.

HINAULT, C.; VAN OBBERGHEN, E.; MOTHE-SATNEY, I. Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 6, p. 374-8, 2006.

HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-6, 2002.

HIRSHMAN, M. F. et al. Exercise training increases GLUT-4 protein in rat adipose cells. **Am J Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 1, p. E882-9, 1993.

HIRSHMAN, M. F. et al. Exercise training increases the number of glucose transporters in rat adipose cells. **Am J Physiol**, v. 257, n. 4 Pt 1, p. E520-30, 1989.

HOPPS, E.; CANINO, B.; CAIMI, G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. **Acta Diabetol**, v. 48, n. 3, p. 183-9, 2011.

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

INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 9, p. 648-57, 2002.

JAKICIC, J. M.; OTTO, A. D. Treatment and prevention of obesity: what is the role of exercise? **Nutr Rev**, v. 64, n. 2 Pt 2, p. S57-61, 2006.

KAHN, B. B. Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1644-54, 1996.

KATOME, T. et al. Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. **J Biol Chem**, v. 278, n. 30, p. 28312-23, 2003.

KATZ, L. D. et al. Splanchnic and peripheral disposal of oral glucose in man. **Diabetes**, v. 32, n. 7, p. 675-9, 1983.

9. Referências

- KEITH, S. W. et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, n. 11, p. 1585-94, 2006.
- KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2748-50, 2001.
- KIM, T. et al. Knockdown of JNK rescues 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by mitochondrial dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 378, n. 4, p. 772-6, 2009.
- KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 227S-31S, 2006.
- KIMURA, M. et al. Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. **Life Sci**, v. 79, n. 22, p. 2105-11, 2006.
- KING, D. S. et al. Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. **J Appl Physiol**, v. 64, n. 5, p. 1942-6, 1988.
- KIRWAN, J. P. et al. Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 88, n. 2, p. 797-803, 2000.
- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr 6 2000.
- KRIEGER, J. W. et al. Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction: a meta-regression 1. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 260-74, 2006.
- KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol**, v. 562, n. Pt 3, p. 829-38, 2005.
- KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Sustained rise in triacylglycerol synthesis and increased epididymal fat mass when rats cease voluntary wheel running. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 3, p. 911-25, 2005.
- KUSMINSKI, C. M. et al. The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 1, p. 270-6, 2007.
- LAMBERT, E. V. et al. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 6, p. 2564-71, 1994.
- LARSEN, T. M. et al. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. **N Engl J Med**, v. 363, n. 22, p. 2102-13, 2010.
- LAYE, M. J. et al. Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue. **J Appl Physiol**, v. 106, n. 1, p. 161-8, 2009.
- LAYMAN, D. K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 261S-267S, 2003.

9. Referências

LAYMAN, D. K. et al. A moderate-protein diet produces sustained weight loss and long-term changes in body composition and blood lipids in obese adults. **J Nutr**, v. 139, n. 3, p. 514-21, 2009.

LAYMAN, D. K.; WALKER, D. A. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 319S-23S, 2006.

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

LEE, W. C. et al. Effects of hiking at altitude on body composition and insulin sensitivity in recovering drug addicts. **Prev Med**, v. 39, n. 4, p. 681-8, 2004.

LEE, Y. H. et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J Biol Chem**, v. 278, n. 5, p. 2896-902, 2003.

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

LEWIS, G. F. et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, n. 2, p. 201-29, 2002.

LI, Y. et al. Protein kinase C Theta inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser(1101). **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 45304-7, 2004.

LIMA, F. B. et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol**, v. 275, n. 6 Pt 1, p. E934-41, 1998.

LIRA, F. S. et al. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 80-5, 2009.

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

LYNCH, C. J. et al. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 3, p. E621-30, 2006.

LYNCH, C. J. et al. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 4, p. E824-35, 2002.

LYNCH, C. J. et al. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E503-13, 2002.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, 2007.

MANTHOU, E. et al. Behavioral compensatory adjustments to exercise training in overweight women. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 6, p. 1121-8, 2010.

MARLES, A. et al. Effect of high-intensity interval training and detraining on extra VO₂ and on the VO₂ slow component. **Eur J Appl Physiol**, v. 99, n. 6, p. 633-40, 2007.

MEIJER, A. J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. **J Nutr**, v. 133, n. 6 Suppl 1, p. 2057S-2062S, 2003.

9. Referências

- MIRALLES-ARNAU, S. et al. Impact of nutritional status on the oral bioavailability of leucine administered to rats as part of a standard enteral diet. **Clin Nutr**, v. 30, n. 4, p. 517-23, 2011.
- MIYAZAKI, S. et al. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. **Life Sci**, v. 86, n. 17-18, p. 691-8, 2010.
- MOGHADASI, M. et al. High-intensity endurance training improves adiponectin mRNA and plasma concentrations. **Eur J Appl Physiol**, 2011.
- MUELLER, D. T.; HERMAN, G.; EIKELBOOM, R. Effects of short- and long-term wheel deprivation on running. **Physiol Behav**, v. 66, n. 1, p. 101-7, 1999.
- MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part II: Long term insufficient training stimulus. **Sports Med**, v. 30, n. 3, p. 145-54, 2000.
- MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. **Sports Med**, v. 30, n. 2, p. 79-87, 2000.
- NEGRAO, C. E. et al. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol**, v. 72, n. 5, p. 1749-53, 1992.
- NEWGARD, C. B. et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. **Cell Metab**, v. 9, n. 4, p. 311-26, 2009.
- NGUYEN, H. T. et al. JNK/SAPK and p38 SAPK-2 mediate mechanical stretch-induced apoptosis via caspase-3 and -9 in NRK-52E renal epithelial cells. **Nephron Exp Nephrol**, v. 102, n. 2, p. e49-61, 2006.
- O'RAHILLY, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 307-14, 2009.
- OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 2, p. 221-9, 2010.
- OTERO, M. et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett**, v. 579, n. 2, p. 295-301, 2005.
- PADDON-JONES, D. Interplay of stress and physical inactivity on muscle loss: Nutritional countermeasures. **J Nutr**, v. 136, n. 8, p. 2123-6, 2006.
- PARK, H. et al. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. **J Biol Chem**, v. 277, n. 36, p. 32571-7, 2002.
- PASMAN, W. J.; WESTERTERP, M. S.; SARIS, W. H. The effect of body weight changes and endurance training on 24h substrate oxidation. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 23, n. 12, p. 1223-32, 1999.
- PATTERSON, C. M.; LEVIN, B. E. Role of exercise in the central regulation of energy homeostasis and in the prevention of obesity. **Neuroendocrinology**, v. 87, n. 2, p. 65-70, 2008.

9. Referências

- PATTI, M. E. et al. Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. **J Clin Invest**, v. 101, n. 7, p. 1519-29, 1998.
- PEDERSEN, B. K. The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 23, p. 5559-68, 2009.
- PEDERSEN, B. K. Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 5, p. 811-6, 2011.
- PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16 Suppl 1, p. 3-63, 2006.
- PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16 Suppl 1, p. 3-63, 2006.
- PEDERSEN, B. K. et al. Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. **Exerc Immunol Rev**, v. 7, p. 18-31, 2001.
- PERES, S. B. et al. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 3, p. 1037-43, 2005.
- PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, 2005.
- PETIBOIS, C. et al. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 7, p. 3377-84, 2004.
- PRADA, P. O. et al. Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in rat tissues. **J Endocrinol**, v. 185, n. 3, p. 429-37, 2005.
- REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, 1997.
- RIBEIRO, F. et al. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? **Int J Cardiol**, v. 141, n. 3, p. 214-21, 2010.
- RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **J Biol Chem**, v. 239, p. 375-80, 1964.
- RODNICK, K. J. et al. Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 267, n. 9, p. 6278-85, 1992.
- ROGERS, M. A. et al. Effect of 10 days of physical inactivity on glucose tolerance in master athletes. **J Appl Physiol**, v. 68, n. 5, p. 1833-7, 1990.
- ROH, C. et al. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 2, p. E322-30, 2003.
- ROPELLE, E. R. et al. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 594-605, 2008.

9. Referências

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

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

ROSENTHAL, J.; ANGEL, A.; FARKAS, J. Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. **Am J Physiol**, v. 226, n. 2, p. 411-8, 1974.

ROSSMEISL, M. et al. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28 Suppl 4, p. S38-44, 2004.

SEALS, D. R. et al. Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. **J Appl Physiol**, v. 56, n. 6, p. 1521-5, 1984.

SHEPARD, T. Y. et al. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 4, p. 703-8, 2001.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27 Suppl 3, p. S49-52, 2003.

SIMONS, P. J. et al. Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. **J Endocrinol**, v. 192, n. 2, p. 289-99, 2007.

SIMPSON, K. A.; SINGH, M. A. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 2, p. 241-56, 2008.

SKOV, A. R. et al. Changes in renal function during weight loss induced by high vs low-protein low-fat diets in overweight subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 23, n. 11, p. 1170-7, 1999.

SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 3, p. 1023-33, 2007.

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

STALLKNECHT, B. et al. Effect of physical training on glucose transporter protein and mRNA levels in rat adipocytes. **Am J Physiol**, v. 265, n. 1 Pt 1, p. E128-34, 1993.

ST-AMAND, J. et al. Effects of mild-exercise training cessation in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, 2011.

STEENSBERG, A. et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 6, p. E1272-8, 2002.

SUN, X.; ZEMEL, M. B. Leucine and calcium regulate fat metabolism and energy partitioning in murine adipocytes and muscle cells. **Lipids**, v. 42, n. 4, p. 297-305, 2007.

9. Referências

TAIVASSALO, T. et al. Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. **Brain**, v. 129, n. Pt 12, p. 3391-401, 2006.

TAKANO, A. et al. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 15, p. 5050-62, 2001.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol Med**, v. 14, n. 3-4, p. 222-31, 2008.

TISCHLER, M. E.; DESAUTELS, M.; GOLDBERG, A. L. Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? **J Biol Chem**, v. 257, n. 4, p. 1613-21, 1982.

TISCHLER, M. E.; GOLDBERG, A. L. Leucine degradation and release of glutamine and alanine by adipose tissue. **J Biol Chem**, v. 255, n. 17, p. 8074-81, 1980.

TORRES-LEAL, F. L. et al. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 8, p. 623-31, 2010.

TORRES-LEAL, F. L. et al. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, n. 1, p. 62, 2011.

TREMBLAY, F.; MARETTE, A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 38052-60, 2001.

TSUBUKU, S. et al. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. **Int J Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 119-26, 2004.

TSUKIYAMA-KOHARA, K. et al. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. **Nat Med**, v. 7, n. 10, p. 1128-32, 2001.

VALLERIE, S. N.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of JNK proteins in metabolism. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 60, p. 60rv5, 2010.

VIANNA, Daiana et al . Protein synthesis regulation by leucine. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 1, Mar. 2010 .

VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, 2009.

VUKOVICH, M. D. et al. Changes in insulin action and GLUT-4 with 6 days of inactivity in endurance runners. **J Appl Physiol**, v. 80, n. 1, p. 240-4, 1996.

WALKER, K. S. et al. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. **Biochem J**, v. 331 (Pt 1), p. 299-308, 1998.

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

9. Referências

WEICHHART, T. et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 565-77, 2008.

YASARI, S. et al. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. **Physiol Behav**, v. 91, n. 2-3, p. 281-9, 2007.

YASARI, S. et al. Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n. 4, p. 367-75, 2006.

YASPELKIS, B. B., 3RD et al. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signalling in rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 110, n. 4, p. 779-88, 2010.

YATAGAI, T. et al. Relationship between exercise training-induced increase in insulin sensitivity and adiponectinemia in healthy men. **Endocr J**, v. 50, n. 2, p. 233-8, 2003.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 52, p. 50230-6, 2002.

YUAN, M. et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-7, 2001.

ZHANG, Y. et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1647-54, 2007.

ANEXOS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Anexo 1. | Normas Específicas da CPG da FCF-USP | 80 |
| Anexo 2. | Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais..... | 80 |
| Anexo 3. | Ficha de Aluno..... | 80 |
| Anexo 4. | Curriculum <i>Lattes</i> | 80 |

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

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

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica



Ofício CEEA/FCF/65/2009

São Paulo, 13 de julho de 2009.

Ilmo(a) Sr(a).
Emídio Marques de Matos Neto
Orientador(a): Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 13 de julho de 2009, **APROVOU** as alterações do projeto "Efeitos da suplementação crônica com leucina nos mecanismos moleculares de indução da obesidade, resistência à insulina e marcadores de inflamação no tecido adiposo de ratos destreinados" (Protocolo CEEA nº 230), bem como a mudança do título para "***Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a expressão de proteínas envolvidas na resistência à ação da insulina no tecido adiposo branco de ratos destreinados***".

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Anexo 3. Ficha do Aluno

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressa...>

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6342653/1 - Emídio Marques de Matos Neto

Email: emidiomatos@usp.br
Data de Nascimento: 28/05/1979
Cédula de Identidade: RG - 1.555.539 - PI
Local de Nascimento: Estado do Piauí
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciado em Educação Física - Universidade Estadual do Piauí - Piauí - Brasil - 2001

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 30/04/2009
Início da Contagem de Prazo: 30/04/2009
Data Limite: 30/10/2011
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco - 30/04/2009 a 27/09/2009
 E.Mail: bfranco@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 28/09/2009 até o presente. E.Mail: tirapegui@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 30/04/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 19/09/11 10:37:49

Anexo 3. Ficha do Aluno

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressa...>

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6342653/1 - Emídio Marques de Matos Neto

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|--------------|---|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|--------------------------|
| NHA5705-2/2 | Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interinstituições: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo) | 05/05/2009 | 08/06/2009 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |
| EEF5705-1/2 | Influência do Treinamento Físico e da Genética no Controle de Peso Corporal (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo) | 18/08/2009 | 29/09/2009 | 60 | 4 | 83.3 | A | N | Concluída |
| EDM5791-5/3 | Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo) | 19/08/2009 | 30/11/2009 | 120 | 0 | 0 | - | N | Pré-matrícula indeferida |
| BMB5818-1/1 | Praticando Análise de Proteínas | 26/08/2009 | 23/09/2009 | 60 | 0 | 0 | - | N | Pré-matrícula indeferida |
| FBA5901-1/2 | Tópicos Avançados em Nutrigenômica | 08/09/2009 | 12/10/2009 | 30 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| FBA5728-2/10 | Aprimoramento Didático | 21/09/2009 | 18/10/2009 | 60 | 0 | 0 | - | N | Pré-matrícula indeferida |
| HNT5759-1/1 | Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 06/10/2009 | 09/11/2009 | 60 | 4 | 93.3 | A | N | Concluída |
| FBC5748-3/2 | Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação | 02/03/2010 | 12/04/2010 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |
| BMB5812-2/2 | Suporte Pedagógico ao Ensino de Fisiologia | 08/03/2010 | 21/06/2010 | 150 | 10 | 90 | A | N | Concluída |
| EDM5791-5/4 | Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo) | 17/03/2010 | 30/06/2010 | 120 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| FBA5728-2/11 | Aprimoramento Didático | 20/04/2010 | 17/05/2010 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |
| EFB5758-1/1 | Redação de Artigos Científicos (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo) | 04/08/2010 | 12/10/2010 | 90 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| BMB5804-2/3 | O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo | 09/08/2010 | 20/09/2010 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |
| EFB5757-1/2 | Fundamentos de Biologia Molecular (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo) | 14/02/2011 | 27/02/2011 | 60 | 4 | 80 | C | N | Concluída |

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
| | Para exame de qualificação | Para depósito da dissertação | |
| Disciplinas: | 25 | 25 | 38 |
| Atividades Programadas: | | | |
| Seminários: | | | |
| Estágios: | | | |
| Total: | 25 | 25 | 38 |

2 de 3

19/09/2011 10:38

Anexo 3. Ficha do Aluno

Ficha do Aluno

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressa...>**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71****Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 19/09/11 10:37:49



Emídio Marques de Matos Neto

Graduado em Licenciatura Plena em Educação Física pela Universidade Estadual do Piauí (2000), especializado em Treinamento Físico Desportivo pela Universidade Federal do Piauí (2007). Atualmente é mestrando em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Tem experiência na área de Treinamento Resistido e Avaliação Física.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 19/09/2011

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/2997584119747885>

Dados Pessoais

Nome Emídio Marques de Matos Neto
Filiação Antonio Ferreira de Matos e Antonia de Melo Lima Matos
Nascimento 28/05/1979 - Teresina/PI - Brasil
Carteira de Identidade 1555539 SSP - PI - 07/07/1997
CPF 82301379353

Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em Ciência dos Alimentos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Brasil
Título: Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a expressão de proteínas envolvidas na resistência à ação da insulina no tecido adiposo branco de ratos destreinados
Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo
- 2004 - 2007** Especialização em Treinamento Físico Desportivo.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
Título: Efeito do treinamento resistido na glicemia capilar em indivíduos de ambos os sexos.
Orientador: Francisco Leonardo Torres Leal
- 1997 - 2000** Graduação em Licenciatura Plena Em Educação Física.
Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil
Título: Obesidade e Musculação
Orientador: Ivaldo Coelho Carmo

Formação complementar

- 2010 - 2010** Novas concepções sobre o papel fisiológico do teci.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Personal Training: planejamento e prescrição de co.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
- 2007 - 2007** Estágio no Laboratório de Bioquímica da Nutrição.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em I SIMPÓSIO AVANÇADO EM TREINAMENTO DESPORTIVO.
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UESPI, FACIME, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em NUTRIÇÃO DESPORTIVA.
Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em BASES FISIOLÓGICAS E DA PERIOD DO TREINAMENTO RESI.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Atividade Física na Saúde e na Doença.
Clínica de Fisioterapia Fernanda Daniel, CFFD, Brasil
- 2000 - 2000** Extensão universitária em Musculação.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
- 2000 - 2000** Extensão universitária em Musculação.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Personal Trainer.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
- 1998 - 1998** Extensão universitária em Métodos de Treinamento Em Musculação.
Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Hidroginástica.
Universidade Estadual do Piauí, UESPI, Teresina, Brasil

Atuação profissional**1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF****Vínculo institucional**

2009 - Atual Vínculo: Outro (aluno) , Enquadramento funcional: Aluno

Atividades

2009 - Atual Projetos de pesquisa, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Participação em projetos:

Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a expressão de proteínas envolvidas na resistência à ação da insulina no tecido adiposo branco de ratos destreinados

2. Universidade Estadual do Piauí - UESPI**Vínculo institucional**

2008 - 2009 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor substituto , Carga horária: 40, Regime: Integral

2005 - 2005 Vínculo: Professor convidado , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 3, Regime: Parcial

Atividades

03/2008 - 03/2009 Graduação, Licenciatura Plena Em Educação Física

Disciplinas Ministradas:

Metodologia do ensino de lutas , Metodologias do treinamento desportivo

02/2005 - 06/2005 Graduação, Atividades Físicas e Saúde

Disciplinas Ministradas:

Personal Trainer

3. Centro de Capacitação e Treinamento de Pessoas - CCTP**Vínculo institucional**

2007 - 2009 Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

10/2007 - Atual Especialização

Especificação:

Nutrição e Atividade Física

4. Empresa Privada - EP**Vínculo institucional**

2006 - 2009 Vínculo: Autônomo , Enquadramento funcional: Servio técnico especializado, Regime: Parcial

Atividades**05/2006 - Atual** Serviço Técnico Especializado, Biotraining Academia*Especificação:*
*Personal Trainer***07/2000 - 04/2006** Serviço Técnico Especializado, Eugênio Fortes Academia*Especificação:*
*Instrutor***Projetos****2009 - Atual** Efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a expressão de proteínas envolvidas na resistência à ação da insulina no tecido adiposo branco de ratos destreinados


Descrição: O treinamento físico tem sido apontado como uma importante estratégia na redução do risco e no tratamento da obesidade, resistência à insulina e doenças associadas como diabetes mellitus II. Por outro lado, o destreinamento leva a um rápido aumento da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina. Nesta perspectiva, estudos com suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada, em especial com o aminoácido leucina (LEU), demonstraram que esse recurso nutricional pode ser efetivo na prevenção da obesidade, resistência à insulina e inflamação. Portanto, o propósito deste estudo será investigar os efeitos da suplementação crônica com leucina sobre a expressão de proteínas envolvidas na resistência à ação da insulina no tecido adiposo branco de ratos destreinados, analisando o possível papel do aminoácido LEU como estratégia para retardar os efeitos deletérios. Para tal, na primeira etapa, serão utilizados ratos Wistar adultos machos, com 200 g de peso corporal, distribuídos em dois grupos: a) Sedentário (n = 8) e b) Treinado (n = 32), em esteira ergométrica; ambos mantidos com ração AIN93-M. Após o período de 8 semanas, 8 animais de cada grupo serão eutanasiados para análise das alterações provocadas pelo treinamento. Numa segunda etapa, os animais serão destreinados e distribuídos em 3 grupos: a) Grupo Treinado (n=8), submetido ao treinamento por 6 semanas; b) Destreinado (n=8) e; c) Destreinado + LEU (n=19). Os animais do grupo (a) e (b) serão mantidos com dieta AIN93-M e os do grupo (c) com a mesma dieta acrescida de 4% de LEU. Para verificar os efeitos da condição experimental, 8 animais de cada grupo serão eutanasiados na sexta semana para análise dos parâmetros propostos.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Integrantes: Emídio Marques de Matos Neto (Responsável); ; Julio Tirapegui; Miriam Helena Fonseca-Alaniz; Marcelo Macedo Rogero; Ivanir Santana de Oliveira Pires; Francisco Leonardo Torres-Leal
Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Ciência de Alimentos
2. Bioquímica da nutrição

Idiomas**Inglês** Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem**Português** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem**Prêmios e títulos****2010** Trabalho selecionado para a apresentação oral, XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica., Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP**Produção em C, T & A****Produção bibliográfica****Artigos completos publicados em periódicos**

1.  Torres-Leal, Francisco L, Fonseca-Alaniz, Miriam H, Teodoro, Gabriela FR, de Capitani, Mariana D, Vianna, Daiana, Pantaleao, Lucas C, MATOS-NETO, Emídio Marques de, Rogero, Marcelo M, Donato Jr, Jose, Tirapegui, Julio
Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. NUTR METAB. , v.8, p.62 - , 2011.

2. MATOS-NETO, Emídio Marques de, TORRES-LEAL, F. L., OLIVEIRA, F. E., Poltronier, F., MARREIRO, D. N. Parâmetros Bioquímicos Relativos ao Magnésio em Nadadores Adolescentes. *Nutrição em Pauta*, v.1, p.44-47 -, 2011.
3. TORRES-LEAL, F. L., SILVA, M. T. B., MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G., Rodrigues, G.P., ARAUJO, D. M. E., MARREIRO, D. N. Efeito da creatina monohidratada na produção de energia e fadiga durante sprints anaeróbicos em jogadores de futebol. *Brazilian Journal of Health*, v.1, p.156-164 -, 2010.
4. LEITAO, H. A., Francisco das Chagas da Rocha, MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G., Torres-Leal, F.L. Efeito Ergogênico da Cafeína sobre o Desempenho Físico Progressivo Máximo em Ciclistas. *Brazilian Journal of Health*, v.1, p.110 - 117, 2010.

Capítulos de livros publicados

1. MATOS-NETO, Emídio Marques de, TIRAPEGUI, J. Beta-hidroxi beta-metil-butiato (HMB) e Atividade Física In: *Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física*. 2 ed. São Paulo : Atheneu, 2011, v.1, p. 145-152.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Oliveira, A.M., MATOS-NETO, Emídio Marques de Efeito da ingestão de diversos tipos de carboidratos na resposta glicêmica e desempenho físico em teste de repetição máxima In: III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins, 2008, Teresina. **III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins**, 2008.
2. MATOS-NETO, Emídio Marques de, TORRES-LEAL, F. L., SILVA, M. T. B., ARAUJO, D. M. E., MARREIRO, D. N. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA MONOHIDRATADA SOBRE A PRODUÇÃO DE POTÊNCIA E FADIGA DURANTE CORRIDA ANAERÓBICA EM JOGADORES DE FUTEBOL In: III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins, 2008, Teresina. **III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins**, 2008.
3. LEITAO, H. A., ROCHA, F. C., MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G., TORRES-LEAL, F. L. EFEITO ERGOGÊNICO DA CAFEÍNA SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO MÁXIMO EM CICLISTAS In: III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins, 2008, Teresina. **III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins**, 2008.
4. TORRES-LEAL, F. L., FONSECA-ALANIZ, M. H., De CAPIATANI, M., MATOS-NETO, Emídio Marques de, TIRAPEGUI, J. O EFEITO DA EXPANSÃO DO TECIDO ADIPOSEO SOBRE A MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE METABOLICA EM RATOS SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA In: III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins, 2008, Teresina. **III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins**, 2008.

Apresentação de Trabalho

1. MATOS-NETO, Emídio Marques de, Trindade,M.C.C., TORRES-LEAL, F. L., Pantaleão, L.C., FONSECA-ALANIZ, M. H., ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J. **Detraining promotes an increase in fat volume, but does not affect glucose tolerance and insulin sensitivity in rats supplemented with leucine**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
2. Pantaleão, L.C., Teodoro, G.F., TORRES-LEAL, F. L., Vianna, D., MATOS-NETO, Emídio Marques de, Silva, N., de Paula,T.D., Trindade,M.C.C., BORDIN, S., TIRAPEGUI, J. **MATERNAL HIGH FAT FEEDING DURING LACTATION IS CRUCIAL TO THE PROMOTION OF AN OBESE PHENOTYPE AND LEADS TO ALTERATIONS IN SKELETAL MUSCLE MORPHOLOGY IN WEANING RATS**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. TORRES-LEAL, F. L., FONSECA-ALANIZ, M. H., Vianna, D., Teodoro, G.F., De CAPIATANI, M., Pantaleão, L.C., MATOS-NETO, Emídio Marques de, TIRAPEGUI, J. **Concentrações de adiponectina são aumentadas após suplementação com leucina em ratos obesos por dieta hiperlipídica**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. Pantaleão, L.C., de Paula,T.D., MATOS-NETO, Emídio Marques de, Teodoro, G.F., TIRAPEGUI, J. **MTOR activity is downregulated in skeletal muscle of offspring of rats fed a high fat diet**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. MATOS-NETO, Emídio Marques de, Trindade,M.C.C., TORRES-LEAL, F. L., Pantaleão, L.C., FONSECA-ALANIZ, M. H., ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J. **Treino físico reduz o volume de adipócitos em ratos, mas não modifica a tolerância à glicose**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. Oliveira, A.M., Torres-Leal, F.L., MATOS-NETO, Emídio Marques de **Efeito da ingestão de diversos tipos de carboidratos na resposta glicêmica e desempenho físico em teste de repetição máxima**, 2009. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)
7. LEITAO, H. A., Francisco das Chagas da Rocha, MATOS-NETO, Emídio Marques de, Rodrigo Galvão Figueiredo, TORRES-LEAL, F. L. **Efeito ergogênico da cafeína sobre o desempenho físico máximo em ciclistas**, 2009. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)
8. Oliveira, A.M., MATOS-NETO, Emídio Marques de **Efeito da ingestão de diversos tipos de carboidratos na resposta glicêmica e desempenho físico em teste de repetição máxima**, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)
9. MATOS-NETO, Emídio Marques de, Torres-Leal, F.L., SILVA, M. T. B., ARAUJO, D. M. E., MARREIRO, D. N. **Efeito da suplementação com creatina monohidratada sobre a produção de potência e fadiga durante corrida anaeróbia em jogadores de futebol**, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)

10. ★ LEITAO, H. A., LEAL, F. L. T., ROCHA, F. C., MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G. **Ergogenic Effect Of Caffeine On The Physical Maximum Performance Of Cyclists**, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)
11. ★ Torres-Leal, F.L., FONSECA-ALANIZ, M., De CAPIATANI, M., MATOS-NETO, Emídio Marques de, TIRAPEGUI, J. **O efeito da expansão do tecido adiposo sobre a manutenção da homeostase metabólica em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica**, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)
12. ★ LEAL, F. L. T., SILVA, M.T.B., MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G., ARAÚJO, D.M.E., RODRIGUES, G.P. **Composição corporal de jogadores de futebol suplementados com creatina monohidratada**, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
13. ★ LEAL, F. L. T., ARAÚJO, D.M.E., SILVA, M.T.B., MATOS-NETO, Emídio Marques de, FIGUEREDO, R. G., MARREIRO, D. N. **Efeito da suplementação com creatina monihidratada no teste de sprint em corrida anaeróbia (RAST)**, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. ★ Aureliano Machado de Oliveira. **Efeito da ingestão de diversos tipos de carboidratos na resposta glicêmica e desempenho físico em teste de repetição máxima**. 2008. Monografia (Treinamento Físico Desportivo) - Universidade Federal do Piauí

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2010. (Congresso)
Treinamento físico reduz o volume de adipócitos em ratos, mas não modifica a tolerância à glicose.
2. **VI Simpósio Ácidos Graxos e Saúde**, 2010. (Simpósio)
3. **7º Congresso Internacional GSSI - Nutrição e atividade física: a teoria que funciona na prática**, 2010. (Congresso)
4. **II Congresso Paulista de Nutrição Esportiva**, 2010. (Congresso)
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Encontro de Pesquisa em Educação Física e Áreas Afins**, 2009. (Encontro)
O efeito da expansão do tecido adiposo sobre a manutenção da homeostase metabólica em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica.
6. **Tecnologia Multiplex**, 2009. (Outra)
7. **V Simpósio Ácidos Graxos e Saúde**, 2009. (Simpósio)
8. **VII Congresso Paulista de Nutrição Clínica; VI Congresso Paulista de Nutrição Humana; I Congresso Paulista de Nutrição Esportiva**, 2009. (Congresso)
9. **V Simpósio Ácidos Graxos e Saúde**, 2009. (Simpósio)
10. **Tecnologia Multiplex**, 2009. (Outra)
11. **Encontro Brasil/Meio-Norte de Atividades Corporais**, 2000. (Encontro)
12. **IV Encontro de Pesquisas e Temas Livres em Educação Física**, 1998. (Encontro)

Organização de evento

1. MATOS-NETO, Emídio Marques de **XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2010. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão**Curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. MATOS-NETO, Emídio Marques de, ARAUJO, D. M. E., FERRAZ, A. S. M. Participação em banca de Aureliano Machado de Oliveira. **Efeito da ingestão de diversos tipos de carboidratos na resposta glicêmica e desempenho físico em teste de repetição máxima**, 2008 (Treinamento Físico Desportivo) Universidade Federal do Piauí
2. ARAUJO, D. M. E., ORSANO, V.S.M., MATOS-NETO, Emídio Marques de Participação em banca de Héclyo dos Anjos Leitão. **Efeito ergogênico da cafeína sobre o desempenho físico progressivo máximo em ciclistas**, 2007 (Treinamento Físico Desportivo) Universidade Federal do Piauí

Graduação

1. MATOS-NETO, Emídio Marques de Participação em banca de Fernando Lopes e Silva Júnior. **Efeitos do método pilates na flexibilidade em mulheres acima de 50 anos**, 2008 (Licenciatura Plena Em Educação Física) Universidade Estadual do Piauí
2. MATOS-NETO, Emídio Marques de Participação em banca de Amariles Oliveira Carvalho e Luiza Helena de Carvalho Soares. **Estudo comparativo entre nível de estresse, bem estar físico e psicológico de praticantes e não praticantes de ginástica laboral da Escola Fazendária do centro administrativo estadual de Teresina-PI**, 2008 Universidade Estadual do Piauí
3. MATOS-NETO, Emídio Marques de Participação em banca de Kasâmio Leal Paraiba e Marina Mayara Vieira Alves. **Prevalência de obesidade em escolares e seus fatores de risco**, 2008 (Licenciatura Plena Em Educação Física) Universidade Estadual do Piauí

Participação em banca de comissões julgadoras**Outra**

1. **Especialização em atividade física e saúde**, 2009 Universidade Federal do Piauí

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 19/09/2011 às 10:53:03.