
CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE- ÁREA DE BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE
HUMANA

LEANDRO PEREIRA DE MOURA

**TREINAMENTO AERÓBIO NA PREVENÇÃO
DA DOENÇA HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA
DECORRENTE DA OBESIDADE EM RATOS**

Rio Claro

Janeiro/2013

LEANDRO PEREIRA DE MOURA

TREINAMENTO AERÓBIO NA PREVENÇÃO DA DOENÇA
HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA DECORRENTE DA OBESIDADE EM
RATOS

Orientador: Maria Alice Rostom de Mello

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências da
Motricidade- Área de Biodinâmica
da Motricidade Humana

Comissão Examinadora

Profa. Dr. Maria Alice Rostom de Mello
Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho
Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra
Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle
Prof. Dr. Michel Barbosa de Araújo
Profa. Dra. Eliete Luciano
Prof. Dr. Ricardo José Gomes

Rio Claro
Janeiro/2013

APOIO FINANCEIRO

FAPESP

BOLSA DE MESTRADO NO PAÍS

PROCESSO: 2010/12718-5

TREINAMENTO AERÓBIO NA PREVENÇÃO DA DOENÇA HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA DECORRENTE DA OBESIDADE EM RATOS

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública mundial e está fortemente relacionada com a resistência à insulina. Esta última encontra-se associada à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), doença caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado, que pode levá-lo à falência. Na atualidade, o tratamento sugerido para DHGNA consiste na diminuição da ingestão de gordura associada à atividade física. Contudo, pouco se sabe quanto aos protocolos de treinamento mais adequados para a prevenção ou tratamento dessa doença. O presente estudo visou analisar os efeitos do exercício físico na intensidade de 80% do limiar anaeróbico (LAn) sobre marcadores de DHGNA em ratos obesos. Para a indução da obesidade, os animais, a partir dos 90 dias de idade, foram mantidos com dieta hiperlipídica/hipercalórica (35% de gordura animal/vegetal) e os animais controles tratados com dieta balanceada (AIN-93M). Todos os animais foram submetidos a testes de lactato mínimo para a identificação do limiar anaeróbico (LAn) durante exercício de natação. Parte dos animais de cada grupo foi submetida ao treinamento por natação, em intensidade equivalente a 80% do LAn, 1 h/dia, 5 dias/semana, por 16 semanas. Outra parte teve o treinamento suspenso após 8 semanas, ficando em observação por 8 semanas adicionais. Outra parte, ainda, permaneceu sedentária ao longo de todo o experimento. Foi possível padronizar um protocolo de determinação da capacidade aeróbia para ratos recém-nascidos, o exercício físico realizado desde a infância até aos 90 dias de idade contribui na redução do ganho de peso, melhora no metabolismo da glicose e menor acúmulo de gordura hepática. O destreinamento fez com que algumas melhorias metabólicas decorrentes do exercício físico fossem neutralizadas, assim como o ganho de peso. Visto isso, conclui-se que a prática regular de exercício físico pode ser uma ferramenta importante para o tratamento da obesidade e da DHGNA.

Palavras-chave: Exercício físico, obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica, ratos.

AEROBIC TRAINING IN PREVENTION OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE RESULTED FROM OBESITY IN RATS

Abstract

Obesity is a public health problem worldwide and is strongly associated with insulin resistance. The latter is associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a disease characterized by accumulation of fat in the liver that can lead you to organ failure. Currently, the suggested treatment for NAFLD is decrease in fat intake associated with increase in physical activity. However, little is known about the most appropriate training protocols for the prevention or treatment of this disease. This study aims to examine the effects of exercise at the intensity of the 80% of anaerobic threshold (AT) on markers of NAFLD in obese rats. To induce obesity, 90 days old rats, will be maintained with a high fat / higher calorie diet (35% of animal fat / vegetable fat). Control rats will be treated with a balanced diet (AIN-93M). All animals will be submitted to the lactate minimum test to identify the anaerobic threshold (AT) during swimming exercise. Part of the animals from each group will be subjected to swimming training in intensity equivalent to 80% of the individual AT, 1 h / day, 5 days / week for 16 weeks, another part of them will have exercise training suspended after 8 weeks, remaining under observation for additional 8 weeks, while others will remain sedentary throughout the experiment. It was possible to standardize a protocol to determine the aerobic capacity to newborn rats, physical exercise performed from infancy up to 90 days of age helps in reducing weight gain, improves glucose metabolism and reduced hepatic fat accumulation. The detraining made that some metabolic improvements resulting from the exercise were neutralized, as well as weight gain. Based on this, it is concluded that regular exercise can be an important tool for the treatment of obesity and NAFLD.

Keywords: Exercise, obesity, nonalcoholic fatty liver disease, rats.

Lista de Abreviações

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

AST – Aspartato Aminotransferase

ALT – Alanina Aminotransferase

HDL – High Density Lipoprotein

LDL - Low Density Lipoprotein

H/E – Hematoxilina/Eosina

RI – Resistência à insulina

TG – Triglicerídeos

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

EH – Esteatose Hepática

EHNA – Esteato-hepatite Não Alcoólica

RCQ – Relação Cintura Quadril

AGL- Ácidos Graxos Livres

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto

NAD - Nicotinamide Adenine Dinucleotide

LAn – Limiar Anaeróbio

MFEL – Máxima Fase Estável de Lactato

LSM – Lactato Sanguíneo Mínimo

°C – Graus Celsius

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animal

S – Grupo Sedentário até 90 dias de idade

T – Grupo Treinado até 90 dias de idade

CS – Grupo Controle sedentário ao longo de todo experimento

HS – Grupo Hiperlipídico Sedentário ao longo de todo o experimento

CT90 – Grupo Controle Treinado até 90 dias de idade

CT150 – Grupo Controle Treinado ao longo de todo o experimento

HT90 – Grupo Hiperlipídico Treinado até 90 de idade

HT150 – Grupo Hiperlipídico Treinado ao longo de todo experimento

cm – centímetros

min – minutos

p.c – Peso Corporal

g – Gramas

Kg – Kilogramas

μL – Microlitros

mmol – milimol

L – Litros

mg – miligramas

dL – Decilitros

TTGo – Teste de Tolerância à Glicose Oral

TTI – Teste de Tolerância à Insulina

CO₂ – Dióxido de Carbono

μCi – Micro Curie

HOMA - Homeostatic Model Assessment

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
Obesidade.....	11
Doença hepática gordurosa não alcoólica e obesidade.....	12
Exercício físico e obesidade.....	14
Determinação do limiar anaeróbio pelo teste de lactato mínimo (TLM).....	16
OBJETIVOS.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
Artigo 1.....	21
Artigo 2.....	30
Artigo 3.....	73
Artigo 4.....	91
Artigo 5.....	109
Artigo 6.....	115
Artigo 7.....	122
Artigo 8.....	129
Outros resultados (em tabelas).....	142
CONCLUSÃO.....	147
REFERÊNCIAS.....	148

1. Introdução

A obesidade é uma doença com fisiopatologia, comorbidades e capacidades desabilitantes próprias (CONWAY & RENÉ, 2004). Esta doença é diagnosticada quando se tem valores de gordura corporal acima dos normais, levando em consideração a estatura, gênero e idade (MARTI & MARTINEZ, 2001).

O aumento do número de obesos em todo o mundo é alarmante, constituindo um importante problema de saúde pública (EBBELING et al, 2002; ELOBEID et al., 2008). De acordo com Deitel (2003), a população obesa e/ou com sobrepeso é de cerca de 1,7 bilhões de pessoas em todo o mundo e no Brasil esse número chega a 51,7% da população (WHO, 2007). Dados preocupantes, uma vez que pessoas obesas tendem a ter diminuição na expectativa de vida (FONTAINE et al., 2003)

O comprometimento da qualidade de vida de uma pessoa obesa é devido às várias doenças decorrentes dessa condição, como: hipertensão arterial, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, doenças coronarianas, diabetes mellitus (DÂMASO, 2003; GUEDES et al., 2006), invalidez (EZZATI et al., 2002) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (ANGULO, 2002; UTZSCHNEIDER et al., 2006), esta última cresce concomitante ao número de incidência de obesidade (CALDWELL et al., 2004; BRUNT, 2005; WILLIAMS, 2006).

A DHGNA é uma doença caracterizada pela presença de gotículas de gordura no fígado (DIEHL et al., 1999) e foi descoberta por Ludwig e colaboradores em 1980 (LUDWIG et al., 1980). Este acúmulo de gordura hepática é encontrado em 57,5 a 75% dos casos de obesidade (ANGULO, 2002), devido a alterações como: aumento do consumo de gordura, diminuição na oxidação e da secreção de lipídeos pelo fígado (BURT & DAY, 1998) ou por outros mecanismos como: resistência à insulina,

estresse oxidativo e resposta inflamatória do organismo (SCHWIMMER et al., 2003; LOUTHAN et al., 2005).

O fígado gorduroso é caracterizado por uma concentração maior ou igual a 5% de gordura em relação ao peso do órgão (LUDWING et al., 1980; GAUDIO et al., 2000) e pode variar desde uma simples esteatose, sem evidências de inflamação, até manifestações necro-inflamatórias, incluindo esteato-hepatite, que em 50% dos casos pode evoluir para fibrose, em 15 % para cirrose e em 3% para falência hepática (SHETH et al., 1997; MULHALL et al., 2002; ANGULO, 2002; ALBA & LINDOR, 2003; UTZSCHNEIDER et al., 2006).

Como ainda não existem medicamentos para o tratamento desta doença, recomenda-se para pessoas diagnosticadas com DHGNA, a diminuição da ingestão de gorduras e a prática regular de atividade física (PARDEE et al., 2009; SOCHA et al., 2009). Pessoas obesas e com DHGNA apresentam resistência à insulina (ZANELLA et al., 2001) e a atividade física por si só consegue melhorar esse quadro (GOODYEAR; KAHN 1998; BASSUK; MANSON 2005).

De acordo com Magarey et al., (2003) a obesidade na infância e adolescência é fator de risco para a obesidade na vida adulta, e com isso, torna-se importante à prática habitual de atividade física nessa etapa da vida. A prática de atividade na adolescência está inversamente relacionada à hipertensão arterial e resistência à insulina na idade adulta (FERNANDES & ZANESCO, 2010) podendo com isso o sedentarismo favorecer a DHGNA. Ainda é muito pouco discutida na literatura se a hipótese de que a atividade física de intensidade moderada realizada regularmente na infância, adolescência e na idade adulta possa minimizar e/ou prevenir lesões hepáticas decorrentes do acúmulo de gordura. A partir disso, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da atividade física moderada desde a infância até a idade adulta de ratos obesos com DHGNA.

2. Revisão de literatura

2.1 Obesidade

A obesidade é um problema de saúde pública mundial e considerada uma doença desde 1985 (GREENWAY & SMITH, 2000) por ser caracterizada como uma condição patológica acompanhada por acúmulo excessivo de gordura levando em consideração estatura, gênero e idade (MARTI & MARTINEZ, 2001).

O número de obesos em todo o mundo aumentou em 100 milhões em um curto período de tempo (1995-2000) perfazendo 15% da população mundial e estimativas mostram que em 2025, o Brasil será o quinto país no mundo na incidência de obesidade (DÂMASO, 2001). Em nosso país o excesso de peso e a obesidade já atingem juntos mais de 30% da população adulta, sendo acompanhada de uma maior morbidade e menor longevidade (MENDES et al., 2006; PELLANDA et al., 2002).

Nos dias atuais, a tecnologia da vida moderna, proporciona métodos de economia de calorias no cotidiano e isso pode trazer prejuízos ao próprio organismo quando se une a uma alimentação com consumo excessivo de alimentos ricos em gordura saturada, bebidas hipercalóricas e baixos níveis de atividade física. Esses fatores ambientais e socioculturais como estilo de vida e uma dieta desbalanceada têm contribuído fortemente para uma obesidade logo na infância, dado preocupante uma vez que esse número vem crescendo chegando a atingir 25-30% de crianças nos países ricos (MENDES et al., 2006; PELLANDA et al., 2002; FISBERG, 2004).

Tais elementos determinam uma pandemia de sobrepeso e obesidade e suas consequentes comorbidades, as doenças cardiovasculares isquêmicas, a doença

hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a resistência à insulina (RI) (RIBEIRO et al., 2006; PINTO; LIMA, 2001; ÂNGULO, 2002). Reaven em 1988 foi um dos primeiros a associar a hipertrofia do tecido gorduroso, comumente encontrado em obesos, com a RI. Um dos motivos é a ação da fração saturada do ácido graxo que interfere negativamente na transdução da via de sinalização da insulina, fazendo com que proteínas serina-quinases sejam fosforiladas (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005). A RI está fortemente relacionada com a DHGNA (BUGIANESI et al, 2005; UTZSCHNEIDER et al, 2006) devido ao maior consumo de alimentos gordurosos, alterando a via de sinalização da insulina como descrito à cima e com isso proporcionando uma alta disponibilidade de ácidos graxos para o fígado, que é a principal fonte de triglicerídeos para esse órgão (GOLDBERG & GINSBERG, 2006).

Pacientes com obesidade mórbida apresentam uma prevalência de mais de 90% de alterações na histologia hepática (MORETO et al., 2003; NEUSCHWANDER-TETRI & CALDWELL 2003). O principal achado histológico é esteatose hepática, o grau mais leve da DHGNA. A incidência da obesidade está aumentando de forma alarmante em várias regiões do mundo paralelamente a um aumento de DHGNA (WILLIAMS, 2006; BRUNT, 2005; CALDWELL et al., 2004). Mais recentemente, a esteatose vem sendo relacionada com fator de risco para cirrose e até mesmo com a falência do próprio órgão (HEIDELBAUGH & BRUDERLY 2006; WILLIAMS, 2006; BRUNT, 2005; ADAMS & ÂNGULO, 2005; MULHALL, ONG, YOUNOSSI, 2005).

2.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica e obesidade

Entre as doenças hepáticas não virais, a doença hepática gordurosa parece ser a mais frequente na população em geral. Suas causas mais comuns incluem diabetes mellitus, desnutrição, ingestão de álcool, toxicidade em consequência de

drogas e obesidade. Sugeriu-se também que comprometimento do metabolismo lipídico, especialmente hipertrigliceridemia, causa essa doença (RODEN et al., 1996).

O acúmulo de gordura no fígado, sem o estímulo de álcool é denominada doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Esse acúmulo representa mais que 5% do peso normal do fígado (LUDWING et al., 1980; GAUDIO et al., 2000), podendo ser acarretada pelo desequilíbrio de lipoproteínas circulantes e pelo desbalanço entre catabolismo e o depósito de gorduras no fígado. Dessa forma ocorre a diminuição de oxidação das gorduras pelo fígado e redução de exportação dos triglicerídeos (TG) pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) a partir do órgão.

Dentro da denominação geral, designa-se esteatose hepática (EH) a DHGNA sem sinais de hepatite e de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), à DHGNA com hepatite. A EH pode levar à EHNA, que através de necro-inflamações pode evoluir para fibrose, cirrose e falência hepática (MULHALL et al, 2002).

Até o presente momento, não existem procedimentos para a predição de quais portadores de EH desenvolverão EHNA e demais complicações associadas. Além disso, os fatores que desencadeiam essa progressão ainda são pouco conhecidos. Assim, é importante que pacientes obesos sejam investigados para a presença de DHGNA. Esta é diagnosticada na clínica através de biópsia hepática, esta técnica não pode ser aplicada em estudos epidemiológicos. Contudo, indivíduos portadores de DHGNA tipicamente apresentam elevadas concentrações séricas de marcadores de lesão hepática, incluindo aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (MUKAI et al., 2002). Sugeriu-se que DHGNA seja a causa mais comum da elevação crônica das concentrações séricas das transaminases hepáticas (CLARK et al., 2003 a). Essas observações indicam que marcadores de

lesão hepática podem ser também marcadores confiáveis da DHGNA em estudos epidemiológicos (MUKAI et al., 2002), embora a magnitude das alterações séricas não permita a diferenciação entre EH e DHGNA (REIS et al., 2001).

Como a prática de exercícios regulares é ferramenta útil no tratamento da obesidade, é de interesse investigar seus efeitos sobre a DHGNA em indivíduos obesos.

2.3 Exercício físico e obesidade

A obesidade, durante muito tempo, foi considerada desordem primariamente decorrente de alta ingestão calórica. Entretanto, hoje há evidências de que grande parte dos casos de obesidade decorre mais do baixo gasto energético que do alto consumo energético. A inatividade física da vida moderna parece ser o mais importante fator etiológico do crescimento dessa doença nas sociedades industrializadas (ERIKSSON et al., 1997).

Estudos mostram forte associação entre obesidade e inatividade física, bem como associação inversa entre atividade física, índice de massa corpórea (IMC), razão cintura-quadril (RCQ) e circunferência da cintura (GUSTAT et al., 2002; LAKKA et al., 2003). Tais estudos demonstram que os benefícios da atividade física para a perda de peso podem ser alcançados com intensidades baixa, moderada ou alta, indicando que a manutenção de um estilo de vida ativa, independente da atividade praticada, pode combater o desenvolvimento dessa doença.

Os efeitos do exercício físico sobre o perfil de lipídios e lipoproteínas são bem conhecidos. Indivíduos fisicamente ativos apresentam maiores níveis de HDL colesterol e menores níveis de triglicérides, LDL e VLDL colesterol, quando comparados a indivíduos sedentários. Estudos de intervenção demonstram que

perfis desfavoráveis de lipídios e lipoproteínas melhoram com o treinamento físico independentemente do sexo, do peso corporal e da adoção de dieta e dependendo da intensidade de exercício essa melhora pode ser mais acentuada (DURSTINE & HASKELL, 1994).

Mesmo sabendo que independente da intensidade de exercício ocorre uma melhora no perfil lipídico é bastante importante o estudo da curva de metabolismo de gordura em função da intensidade de esforço. A maior utilização de gordura como substrato energético ocorre próximo a 60-65% $VO_2\text{max}$ (ACHTEN, GLEESON, JEUKENDRUP, 2002; ACHTEN, JEUKENDRUP, 2003). Em intensidades elevadas, como a 85% $VO_2\text{max}$, observa-se uma diminuição significativa no uso de gordura como fonte de energia, devido parcialmente à reesterificação dos TGs no tecido adiposo (GREEN et al., 1979) levando a uma menor concentração de ácidos graxos livres (AGL) circulantes (PRUETT, 1970; ROMIJN ET AL., 1975). Isso ocorre porque há um aumento do lactato sanguíneo e, conseqüentemente, aumenta a razão NADH/NAD, elevando formação de α - glicerolfosfato, o qual se liga aos ácidos graxos não transportados ao sangue, formando uma nova molécula de TG (ISSEKUTZ et al., 1965; ISSEKUTZ, SHAW, ISSEKUTZ, 1975).

A grande reserva de triglicérides presentes no tecido adiposo é mobilizada a uma velocidade lenta durante o exercício. Enquanto realizamos o exercício, vários hormônios como as catecolaminas, o glucagon, o hormônios do crescimento, os corticóides, entre outros, são liberados na corrente sanguínea, e quando chegam aos adipócitos, provocam lipólise aumentando as concentrações sanguíneas de AGL. Segundo Arner et al.(1990), o primeiro fator responsável pela lipólise durante o exercício físico é o aumento da concentração plasmática de epinefrina, a qual ativa os betarreceptores dos adipócitos. Em repouso, cerca de 70% dos AGL liberados durante a lipólise são recombinados com moléculas de glicerol ressintetizando os

triglicérides nos adipócitos, porém durante os exercícios de baixa intensidade, esse processo é atenuado, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento na lipólise. Ao chegar ao plasma, as moléculas de AGL se ligam à albumina plasmática e são transportadas pela circulação sanguínea. Alguns AGL são liberados da albumina e ligados à proteína intramuscular, a qual, por sua vez, transporta os AGL para as mitocôndrias onde são oxidadas (TURCOTTE et al. 1991).

O processo de defesa ou prevenção do organismo frente a obesidade é bastante discutido. É sabido que a prática regular de atividade física pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios de condições patológicas, como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica (ZANESCO, ANTUNES, 2007). Além disso, tem sido relatado que alterações celulares associadas com o desenvolvimento dessas doenças crônicas na idade adulta são iniciadas na infância (SINAIKO, 2007). Visto isso, fica claro que é de extrema importância o conhecimento da idade do indivíduo na qual o exercício físico será prescrito, assim como a determinação da intensidade de exercício para prescrição de treinamento.

2.4 Determinação do limiar anaeróbio pelo teste de lactato mínimo (TLM)

Em 1964, Wasserman e Mc. Ilroy empregaram o termo Limiar Anaeróbio (LAn) no sentido que, durante o exercício, o aumento abrupto do CO_2 reflete numa mudança metabólica em direção ao sistema anaeróbio. Kinderman et al. (1979), após realização de testes de exercícios com cargas progressivas em atletas bem condicionados, postularam a existência do LAn marcado quando a concentração sanguínea de lactato atingisse o valor de 4,0 mmol/L. Estudos anteriores já haviam demonstrado que o LAn corresponde ao aumento desproporcional do lactato sanguíneo em resposta a uma carga de exercício (MADER et al., 1986).

Em 1985, Heck e colaboradores realizaram testes de exercícios com carga constante, em humanos, e avaliaram o lactato sanguíneo. Esses autores observaram que, independentemente da capacidade aeróbia individual, uma máxima fase estável (MFEL) era atingida com 4,0 mmol/L de lactato sanguíneo.

Nas últimas décadas ficou demonstrado que o LAn é bom preditor do desempenho em exercício de longa duração e da aptidão física (SJODIN et al., 1981; BENECKE, 1995). Conquanto as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas, a determinação de “limiares”, isto é, determinação da intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo começa a se acumular desproporcionalmente, tem-se mostrado ferramenta útil na prescrição de exercício e na avaliação das capacidades físicas (SJODIN et al., 1981; BENECKE, 1995; SIMÕES, 2000).

Na prática, o LAn tem sido determinado submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas com concomitante avaliação da concentração do lactato sanguíneo. A determinação do LAn pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante. O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica a transição do metabolismo, conforme definiram Wasserman e Mc. Ilroy (1964) e Kinderman et al. (1979). Já o segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato (4,0 mmol/L), ocorre um equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, como postularam Heck et al. (1985).

Em 1993, Tegtbur et al. desenvolveram um teste para determinação do LAn denominado teste do lactato mínimo. Esse teste envolve a realização de exercício

supra máximo, por um breve período de tempo, visando a indução de hiperlactacidemia antes do início do teste padrão com cargas progressivas em esteira rolante. Uma curva em forma de “U” é obtida com os dados de lactato sanguíneo durante o teste progressivo, sendo o lactato sanguíneo mínimo (LSM), definido como a velocidade na qual esta curva atinge o nadir. Sendo assim, a carga de trabalho correspondente à menor concentração de lactato sanguíneo durante o teste identifica o LAn, e tem sido considerada a intensidade de exercício correspondente ao ponto de equilíbrio entre a produção e a remoção do lactato sanguíneo (TEGTBUR et al., 1993; CAMPBELL, 1998; CARTER et al., 2000; BAILIKIAN JUNIOR et al., 2001; SIMÕES, 2002) ou MFEL (BACON & KERN, 1999; MacINTOSH et al., 2002). Este protocolo tem sido considerado um método válido para se avaliar o desempenho físico, sendo também considerado um protocolo que permite identificar a intensidade correspondente à MFEL em apenas uma sessão de teste (CAMPBELL, 1998; BACON & KERN, 1999; TEGTBUR et al., 2001; MacINTOSH et al., 2002; SIMÕES, 2002; SIMÕES et al., 2004).

A determinação do LAn tem-se mostrada, também, valiosa em estudos clínicos (WASSERMAN & Mc. ILROY, 1964; NEIVA et al., 1999). Uma vez que existem limitações óbvias nas pesquisas com seres humanos, em especial nos estudos clínicos, modelos animais têm fornecido importantes informações quanto à origem e às consequências de muitas doenças bem como do papel do exercício na prevenção e no tratamento dessas doenças. Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é frequentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Por essa razão, recentemente em nossos laboratórios, foram padronizados protocolos para determinação do LAn, baseado no teste do lactato mínimo, adaptado as condições do rato (VOLTARELLI et al, 2002; ARAÚJO et al., 2007;

MELLO et al., 2010). Isso permitiu a estimativa do LAn individual e um controle mais acurado dos protocolos de exercício aplicados a esses animais.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Tendo em vista que a obesidade é um problema de saúde pública mundial e precursora de várias outras doenças, diminuindo a qualidade de vida do indivíduo, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do exercício físico na prevenção dos transtornos metabólicos desenvolvidos no fígado decorrentes da obesidade induzida na idade adulta pela ingestão de dieta hiperlipídica/hipercalórica em ratos.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar o limiar anaeróbico de ratos Wistar alimentados com dieta balanceada ou hiperlipídica/hipercalórica a partir dos 90 dias de idade, através do teste de lactato mínimo aos 28, 50, 70, 110 e 150 dias de idade;
2. Analisar a tolerância à glicose, pelo teste de tolerância à glicose oral, e a sensibilidade periférica à insulina, pelo teste de tolerância à insulina, dos animais aos 28, 90 e 150 dias de idade;
3. Avaliar as concentrações hepáticas de lipídios totais, triglicerídeos e as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT), como marcadores de DHGNA;
4. Analisar perfil lipídico sérico: triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL, ácidos graxos livres;
5. Determinar concentrações séricas de glicose e insulina;

6. Realizar análise histológica do fígado por hematoxilina/eosina (H/E), na busca de possíveis lesões ou complicações adicionais ao acúmulo de lipídios;
7. Analisar a atividade lipogênica hepática, muscular e adiposa aos 28, 90 e 150 dias de idade;
8. Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a capacidade aeróbia dos animais, os aspectos metabólicos e histológicos e os marcadores de DHGNA acima relacionados.

4. Materias, métodos, resultados e discussões

Os materiais, métodos, resultados e discussões da presente dissertação estão apresentados sob forma de artigos e tabelas.

4.1 Artigo 1: Uma vez que o presente projeto de pesquisa visou analisar os efeitos do exercício físico e de sua cessação no acúmulo de gordura hepática, primeiramente fez-se necessário estabelecer um protocolo para indução à esteatose hepática não alcoólica, portanto o primeiro estudo objetivou estabelecer um protocolo de indução ao acúmulo de gordura hepática.

Publicado – MOURA LP et al. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. *Revista de Nutrição (Impresso)*, v. 25, p. 685-693, 2012.

Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética¹

Hepatic biochemical changes in rats submitted to a high-fat/high-energy diet

Leandro Pereira de MOURA²

Rodrigo Augusto DALIA²

Michel Barbosa de ARAÚJO²

Amanda Christine da Silva SPONTON²

José Rodrigo PAULI³

Rodrigo Ferreira de MOURA²

Maria Alice Rostom de MELLO²

RESUMO

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo analisar as alterações bioquímicas hepáticas decorrentes da administração de uma dieta hiperlipídica/hiperenergética em ratos.

Métodos

Foram utilizados 20 ratos (Wistar) com 90 dias de idade divididos em dois grupos, grupo-controle constituída por ratos eutróficos alimentados com dieta comercial para roedores e grupo-dieta constituída por ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica/hiperenergética semi purificada feita com 35% de gordura sendo 31% de origem animal a qual possui 39% de gordura saturada e 4% de origem vegetal (óleo de soja). Os animais do grupo-controle foram mantidos com dieta comercial Purina® e o grupo-dieta com uma dieta hiperlipídica/hiperenergética constituída por 35% de gordura. Após 60 dias de administração de uma dieta hiperlipídica/hiperenergética, analisou-se massa corporal, sensibilidade à insulina, concentração sérica de glicose, insulina e ácidos graxos livres e medida do nível de triglicerídeos, lipídeos totais e atividade lipogênica hepática.

Resultados

O grupo-dieta apresentou maior massa corporal e resistência à insulina. No sangue não foram encontradas diferenças entre os grupos para os níveis de glicose. Foi evidenciada maior concentração de insulina e de

¹ Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo: 2010/12718-5), Fundação para o Desenvolvimento da Universidade Estadual de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Educação Física. Av. 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: LP MOURA. E-mail: <leandropereiram@hotmail.com>.

³ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Curso de Ciências do Esporte. Limeira, SP, Brasil.

ácidos graxos livres no soro para o grupo-dieta. No fígado o nível de lipídeos totais, triglicerídeos e taxa lipogênica foram superiores às do grupo-controle.

Conclusão

Portanto, nossos achados demonstram que dois meses de ingestão de dieta hiperlipídica/hiperenergética por ratos adultos eleva o peso corporal, ácidos graxos livres hepáticos, diminui a sensibilidade à insulina, demonstrando sinais típicos de doença hepática gordurosa não-alcoólica.

Termos de indexação: Dieta hiperlipídica. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Resistência à insulina. Sobrepeso.

ABSTRACT

Objective

The present study analyzed the biochemical and hepatic changes in adult rats fed a high-fat diet for two months.

Methods

Twenty Wistar rats 90 days old were divided into two groups, a control group consisting of normal weight rats fed a commercial rat chow and a diet group consisting of normal weight rats submitted to a semi-purified high-fat, high-energy diet. The animals in control group were kept on a commercial Purina® chow and those in diet group on a high-fat/high-energy diet containing 35% fat, of which 31% were from animal source (39% saturated fat) and 4% were from vegetable source (soybean oil). After 60 days of this experimental diet, the following were assessed: body weight, insulin sensitivity, blood glucose, serum insulin and free fatty acids, triglycerides, total lipids and hepatic lipogenic activity.

Results

Diet group presented higher body mass and insulin resistance. Blood glucose did not differ between the groups. A higher level of serum insulin and free fatty acids were found in diet group. Total lipids, triglycerides and lipogenic rate were also higher in group D.

Conclusion

Therefore, the present findings demonstrate that two months of a high-fat/high-energy diet increases the body weight and hepatic free fatty acids and decreases insulin sensitivity of adult rats, typical signs of non-alcoholic fatty liver disease.

Indexing terms: Diet, high-fat. Non-alcoholic fatty liver disease. Insulin resistance. Overweight.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os países em desenvolvimento passam por uma transição nutricional, caracterizada pela diminuição da prevalência da desnutrição e pelo aumento da obesidade¹. Desde a década passada, a obesidade tem sido considerada a mais importante desordem nutricional nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, acometendo mais de 10,0% da população mundial². Em 2002, 38,8 milhões de brasileiros adultos estavam acima do peso; hoje essa taxa chega a 54,2% da população do País, e cresce acentuadamente, indiferentemente de sexo e idade³. Definida como doença desde 1985 e caracterizada por

acúmulo excessivo de gordura, a obesidade é um problema de saúde pública mundial que pode desencadear a morte^{4,5}.

O consumo de gordura aumentou em todo o mundo e ficou claro que, ao lado da alta quantidade energética dos alimentos atualmente consumidos, certas composições dietéticas que associam o consumo excessivo de gorduras saturadas e sal e o consumo insuficiente de frutas e hortaliças aumentam a adiposidade corporal e apresentam forte associação com doenças crônicas degenerativas não transmissíveis⁶.

O comprometimento da qualidade de vida de uma pessoa obesa decorre das várias doenças associadas a essa condição, como: câncer⁷, hiper-

tensão arterial, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, doenças coronarianas, diabetes *Mellitus*⁸, invalidez⁹ e Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA)¹⁰, que cresce concomitante à incidência de obesidade¹¹.

O acúmulo de gordura no fígado é decorrente, principalmente, da elevação dos Ácidos Graxos Livres (AGL) na corrente sanguínea¹². O AGL em excesso, caso não seja oxidado ou transportado para a circulação em forma de lipoproteínas de baixa densidade, pode ser sintetizado em triacilgliceróis e depositado no fígado, podendo dar início à DHGN¹² e reduzir o clearance hepático de insulina, aumentando assim a produção hepática de glicose, fatores-chaves no processo de Resistência à Insulina (RI)¹³. O aumento do AGL circulante vai atuar, também, nos receptores de insulina, debilitando seu funcionamento nos diversos tecidos e com isso levando à hiperglicemia e hiperinsulinemia¹⁴. O fígado gorduroso, caso não diagnosticado e não tratado, pode levar a um aumento dos tecidos conjuntivos do fígado, conduzindo o órgão à falência¹⁰. Diante do exposto e das limitações éticas das pesquisas com humanos, como o envolvimento de técnicas invasivas, o presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações bioquímicas e do metabolismo hepático decorrentes da oferta de uma dieta hiperlipídica/hiperenergética em ratos.

MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 30 ratos Wistar jovens (90 dias de idade e massa corporal de Média (M)=400,18, Desvio-Padrão (DP)=41,88g no início do experimento). Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Botucatu (SP) foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física do Instituto de Biologia (IB) da Unesp de Rio Claro (SP). Os ratos foram tratados com ração/dieta e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (quatro ratos em cada gaiola) à temperatura ambiente de M=22, DP=1°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 de escuro.

O experimento foi realizado de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). O Protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA), do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro, Protocolo nº 2010/4573.

O período experimental foi de 60 dias. Os animais do grupo-controle foram mantidos com dieta equilibrada (PURINA®, 3.028kcal/kg), e os animais do grupo experimental foram mantidos com dieta desequilibrada semipurificada hiperlipídica/hiperenergética (5.350kcal/kg), composta por (g%): amido de milho=26,4; caseína=14; dextrina=8,8; sacarose=5,6; lipídeos=35 (sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja Sadia®) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia®)) microcelulose=5, mistura de sais minerais=3,5; mistura de vitaminas 1,0; L-cistina=1,8 e bitartarato de colina=2,5.

A composição detalhada das misturas de sais minerais e de vitaminas empregadas na confecção da dieta hiperlipídica/hiperenergética achase descrita em Reeves *et al.*¹⁵.

Os grupos experimentais formados por ratos Wistar com 90 dias de idade foram divididos em dois grupos conforme administração da dieta: grupo-controle (C), constituído por 10 ratos tratados com ração comercial Purina®; e grupo-dieta (D), constituído por 10 ratos tratados com dieta semipurificada hiperlipídica/hiperenergética ao longo de todo período experimental.

Todos os animais tiveram massa corporal registrada no final do experimento por meio de balança semianalítica (Marte Balance®).

A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo Teste de Tolerância à Insulina (TTI). Para isso, foi realizada uma primeira coleta de sangue através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo zero). Em seguida, uma solução de insulina cristalina "LILLY U 40", na dose de 30mU/100g de peso corporal, foi administrada via subcutânea. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e

calibrados para 25µL, visando à determinação das concentrações de glicose, utilizando kits comerciais (Laborlab®). Um único corte na extremidade da cauda do animal foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $(0,0693/t_2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue nos momentos após a administração de insulina em que a glicose sérica decaiu¹⁶.

No final do experimento, 48 horas depois da última avaliação *in vivo*, os animais na condição alimentada e em repouso foram sacrificados depois de serem anestesiados com gás carbônico; seu sangue foi coletado, centrifugado a 3.000rpm por 15 minutos, e, através das amostras do soro, foram realizadas as análises de glicose (Kit Laborlab®), insulina por método de radioimunoensaio¹⁷ e AGL¹⁸. Aliquotas do fígado foram retiradas para determinação de lipídeos totais e triglicerídeos. As amostras foram colocadas em tubos com TritonX-100 a 0,1%, e, em seguida, foram homogeneizadas em Polytron® por 20 segundos em velocidade máxima; após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas a 4.000rpm por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi extraído para a determinação dos lipídeos totais¹⁹ e

triglicerídeos por espectrofotometria através de kit comercial (Laborlab®).

Um lote de animais ($n=5$ animais/grupo) que receberam o mesmo tratamento descrito anteriormente foi sacrificado 60 minutos após receberem administração intraperitoneal de 3mCi 3H_2O . Aliquotas do tecido hepático foram extraídas e pesadas para determinação da taxa de lipogênese, utilizando-se água triciada, como previamente descrito por Robinson & Williamson²⁰. A taxa de síntese de lipídeos foi expressa em µmol de 3H_2O incorporada em lipídeos por hora, por grama de tecido.

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. O teste *t* de Student para amostras independentes foi empregado para a comparação entre as médias do peso corporal no final do experimento, taxa de remoção de glicose sérica (Kitt), concentrações séricas de glicose, insulina e AGL e lipídeos totais e triglicerídeos hepáticos. O nível de significância estabelecido foi de $p<0,05$.

RESULTADOS

No término do período experimental, os animais do grupo D tiveram sua massa corporal superior aos do grupo C (Figura 1A). A sensibi-

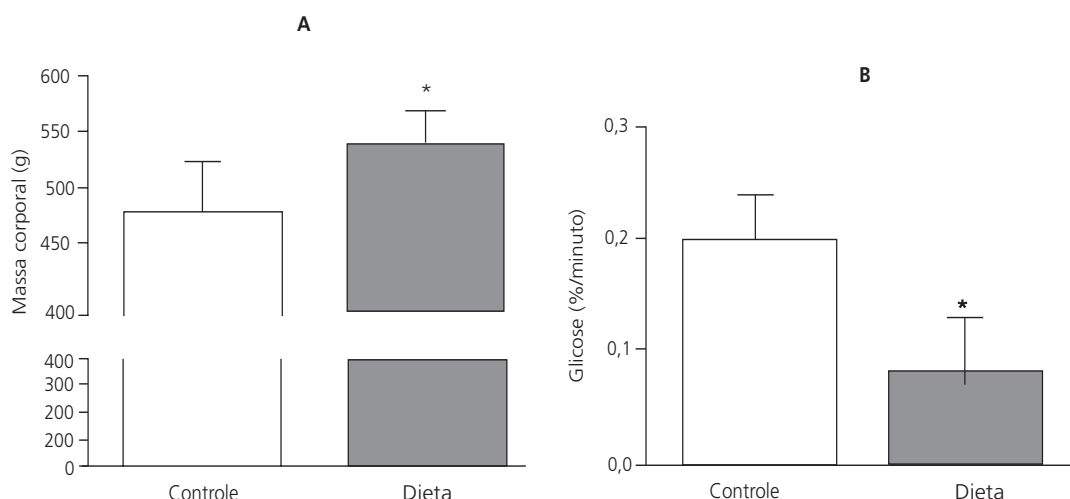


Figura 1. Massa corporal (A), teste de tolerância à insulina (taxa de remoção de glicose/minuto) (B) ao final de 60 dias de experimento. Resultados expressos com média e desvio-padrão ($n=10$ /grupo).

Nota: * = diferente do grupo-controle (teste *t*, $p<0,05$).

lidade periférica à insulina do grupo D foi inferior quando comparada ao grupo C (Figura 1B).

As concentrações séricas de glicose não apresentaram diferenças entre os grupos estudados ao final do experimento (Figura 2A). Os níveis séricos de insulina e AGL foram maiores para o grupo D em relação ao grupo C (Figura 2B e 2C).

A atividade lipogênica hepática foi superior para o grupo D em relação ao C ao final do experimento (Figura 3A). A quantidade de lipídeos totais hepáticos encontrada no grupo D foi superior em relação à encontrada no grupo C (Figura 3B). O acúmulo de gordura em forma de triglicerídeos no fígado foi superior para o grupo D em relação ao grupo C (Figura 3C).

DISCUSSÃO

Devido ao aumento no consumo de gordura em todo o mundo, faz-se necessária maior investigação das consequências do alto consumo de lipídeos, especificamente, para o fígado. De acordo com os dados aqui obtidos, ficou claro que o alto consumo de gordura leva a um quadro de obesidade, com aumento das concentrações de AGL séricas, que irá interferir tanto na sinalização da insulina, levando a RI, quanto contribuir para a síntese de triglicerídeos hepáticos, que conduz à DHGNA.

Desde 2003, existem mais de 30 modelos genéticos de obesidade descritos²¹. Contudo, outros procedimentos também vêm sendo usados

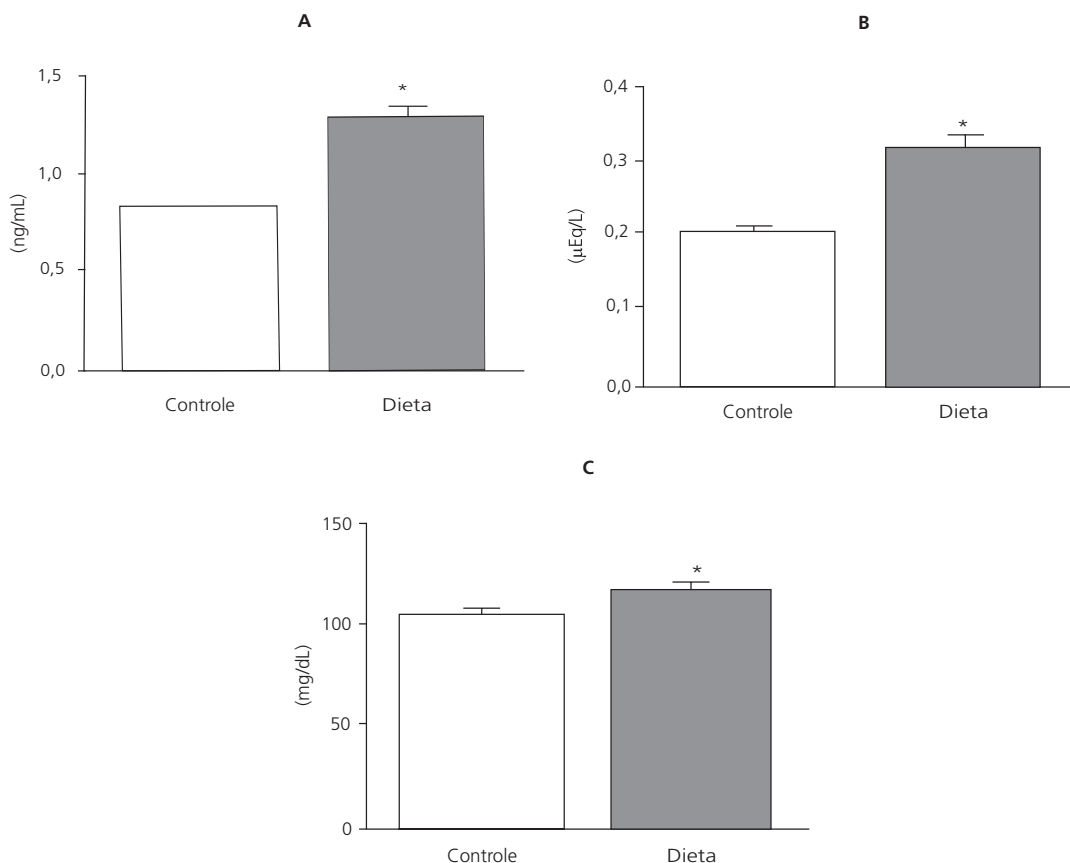


Figura 2. Glicose (A), insulina (B) e AGL (C) séricos ao final de 60 dias de experimento. Resultados expressos com média e desvio-padrão (n=10/grupo).

Nota: * = diferente do grupo-controle (teste t, $p < 0,05$).

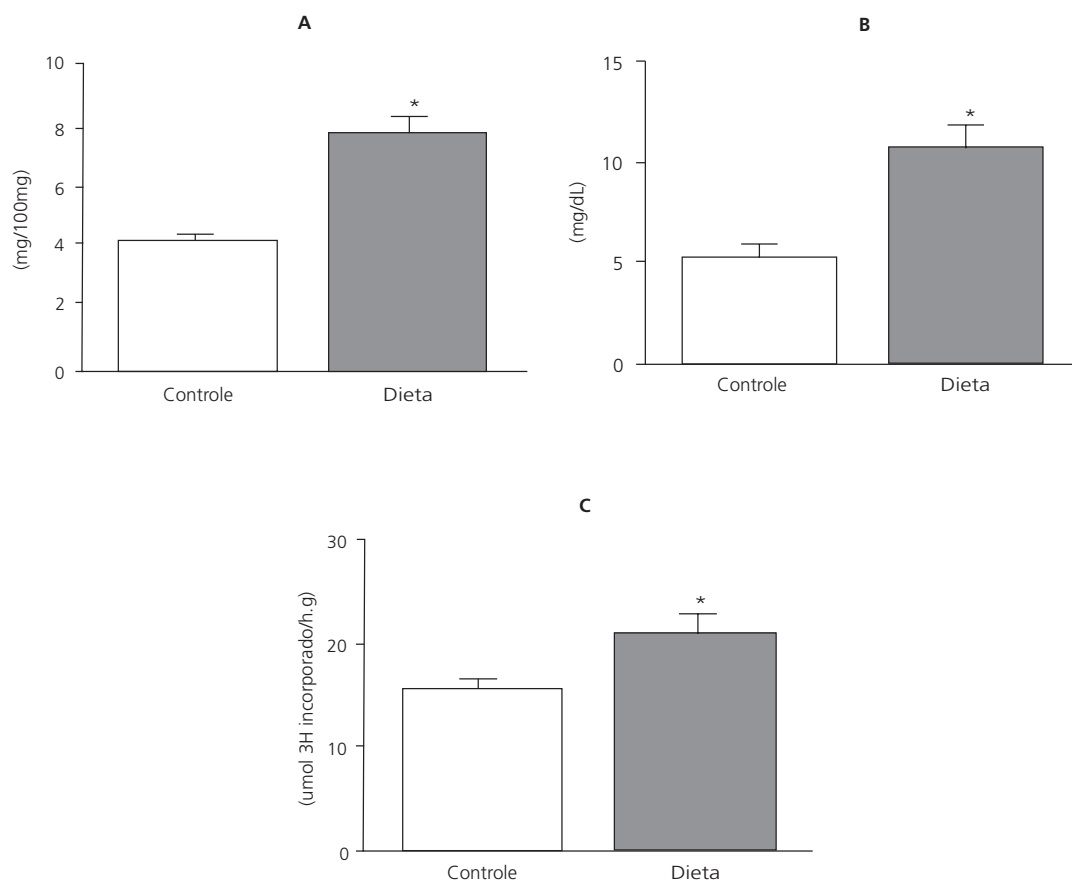


Figura 3. Lipogênese (5 animais/grupo) (A), lipídeos totais (B) e triglicerídeos (C) hepáticos ao final de 60 dias de experimento. Resultados expressos com média e desvio-padrão (n=10/grupo).

Nota: * = diferente do grupo-controle (teste *t*, $p < 0,05$).

para mimetizar a má alimentação do ser humano e, concomitantemente, o desenvolvimento da obesidade, como dieta hiperenergética²² ou indução neural da obesidade através do uso do Glutamato Monossódico (MSG), que destrói o núcleo arqueado do hipotálamo, responsável pela regulação complexa dos hormônios e neuropeptídeos responsáveis pelo controle do peso em roedores²³.

Muitas pesquisas têm sido feitas em torno do desequilíbrio nutricional das dietas para ratos. Com o intuito de mimetizar a alimentação desequilibrada humana e seus transtornos decorrentes, como resistência à insulina ou obesidade, tem-se obtido êxito através do uso de modelos experimentais com animais²³. Na atualidade, uma

estratégia de pesquisa bastante utilizada para o desenvolvimento da obesidade é a administração de uma dieta rica em lípides a roedores²⁴.

A gordura como substrato energético oferece 9kcal/g de energia, proporcionando um balanço positivo e, conseqüentemente, acúmulo em forma de triglicerídeos, caso ela não seja mobilizada para suprir a necessidade do organismo²⁵. De acordo com alguns estudos, a grande oferta de energia unida à inatividade física auxilia o ganho de peso e acúmulo de gordura corporal, como visto no presente estudo, que corrobora a literatura^{7,24}. Nesses estudos, ratos alimentados com dieta hiperlipídica (35% de lipídeos) foram comparados a outros que receberam dieta equili-

brada contendo 4% de gordura vegetal para as necessidades básicas do organismo. O ganho de peso dos animais alimentados com dieta hiperlipídica foi relativamente maior do que dos mantidos com dieta equilibrada^{7,24}.

Os resultados do presente trabalho corroboram, ainda, uma revisão literária feita por Cesaretti & Kohlmann Jr.²⁶ e outros estudos experimentais em animais^{24,27} em que os autores mostraram que a utilização de dieta hiperlipídica/hiperenergética é o modelo experimental que mais se assemelha à RI e à obesidade encontradas em seres humanos.

O aumento no consumo de gordura ou a incompleta inibição da enzima lipase, hormônio sensível decorrente da RI, faz com que os níveis de AGL séricos aumentem²⁸. Esses AGL podem ser convertidos em triglicerídeos no fígado¹². A RI foi definida por Himsworth & Kerr²⁹ como diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, ocasionando uma resposta glicêmica deficiente à insulina exógena, encontrada em pessoas obesas com diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2). Essa perda de sensibilidade ao hormônio está relacionada a um estado em que são necessárias concentrações elevadas de insulina para manter a homeostase glicêmica, levando ao quadro de hiperinsulinemia³⁰.

A responsividade dos tecidos à insulina pode sofrer danos devido à elevação nas concentrações de AGL no sangue. Os AGL desempenham importantes funções fisiológicas no músculo esquelético, coração, fígado e pâncreas, mas seu aumento compromete a via de sinalização da insulina, podendo induzir em indivíduos com DM2 o agravamento da resistência periférica e a queda da secreção de insulina após um período de hiperinsulinemia³⁰. Esse quadro de DM2 com elevação de AGL reduz a captação de glicose pelos tecidos por comprometer a transmissão de sinal na via de sinalização da insulina, com consequente diminuição no número de GLUT-4 translocados para a membrana plasmática. Neste estudo ficou claro o sucesso da indução da obesidade e das alterações decorrentes, como hiperinsulinemia, dimi-

nuição da sensibilidade à insulina e aumento das concentrações séricas de AGL.

A administração da dieta hiperlipídica gerou obesidade associada a aumento nas concentrações séricas de AGL, o que possivelmente prejudicou a via de sinalização da insulina, gerando um quadro de RI. Essas duas alterações estão fortemente relacionadas ao acúmulo de gordura no fígado³¹. O aumento de gordura circulante proporciona maior disponibilidade de gordura para o fígado e esta maior oferta associada a uma baixa taxa de catabolismo leva a um desequilíbrio entre absorção, síntese e exportação de gordura, gerando acúmulo de lípidos nesse órgão e iniciando a DHGNA^{12,30}.

Doença hepática gordurosa não alcoólica é caracterizada principalmente pela presença de macrogotículas de gordura no hepatócito. Na ausência de processos inflamatórios, esse fenômeno é conhecido como esteatose hepática³². Uma forma segura de analisar a instalação da DHGNA é mensurar a quantidade de gordura armazenada no órgão (TG e lipídeos totais) e juntamente analisar a quantidade de gordura que está sendo sintetizada no próprio tecido (atividade lipogênica). Neste estudo, conseguimos combinar essas análises e verificar o total de gordura que foi armazenada e a quantidade que foi sintetizada em um curto espaço de tempo (uma hora). Podemos correlacionar esses achados com os de Oosterveer *et al.*³³, que também analisaram a atividade lipogênica e encontraram, assim como neste estudo, a instalação da DHGNA através da administração de dieta rica em gordura.

CONCLUSÃO

Portanto, na luz desses achados, observa-se que a oferta de dieta hiperlipídica/hiperenergética a ratos adultos, no período de dois meses, induz aumento da massa corporal e da concentração de ácidos graxos livres no fígado e reduz a sensibilidade à insulina: sinais característicos da DHGNA.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos Clarice Sibuya e José Roberto Rodrigues, ao Professor Dennys Esper Correa Cintra, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro, e a Corn Products Brasil®, pela doação do material da dieta usado no experimento.

COLABORADORES

Todos os autores colaboraram para o estudo na coleta, análise e discussão dos dados e na redação do manuscrito, sendo que todos leram e aprovaram a versão final.

REFERÊNCIAS

- Amuna P, Zotor FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc.* 2008; 67:82-90.
- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO; 1998. Report of a WHO Consultation on Obesity.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2008.
- Marti A, Marcos A, Martinez J. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev.* 2001; 2(2):131-40.
- Mendes MJFL, Alves JGB, Alves AV, Siqueira PP, Freire EFC. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2006; 6:49-54.
- World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003. WHO Technical Report Series, 916.
- Seth D, Garmo H, Wigertz A, Holmberg L, Hammar N, Jungner I, *et al.* Lipid profiles and the risk of endometrial cancer in the Swedish AMORIS study. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012; 3(2):122-33.
- Guedes DP, Guedes JERD, Barbosa DS, Oliveira JA, Stanganelli LCR. Fatores de risco cardiovasculares em adolescentes: indicadores biológicos e comportamentais. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86:439-50.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Van Der Hoorn S, Murray CJL. The comparative risk assessment collaborating group: selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet.* 2002; 360(9343):1347-60.
- Utzschneider KM, Kahn SE. Review: the role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:4753-61.
- Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology.* 2006; 44:521-6.
- Goldberg IJ, Ginsberg HN. Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2006; 130(4):1343-46.
- Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(2):304-12.
- Pratchayasakul W, Kerdphoo S, Petsophonakul P, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn SC, *et al.* Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone. *Life Sci.* 2011; 88(13-4): 619-27.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11):1939-51.
- Lundbaeck K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes *Mellitus*. *Br Med J.* 1962; 1(529):1507-13.
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. Coated Charcoals immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1965; 25(10):1375-84.
- Regow BJM, Cornelissen PJHC, Helder APR, Spijkers JBF, Weeber YMM. Specific determination of free fatty acid in plasma. *Clin Acta Chim.* 1971; 31(1): 187-95.
- Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP, Hirata RDC. Métodos de bioquímica clínica: técnicas e interpretação. São Paulo: Pancast; 1990.
- Robinson AM, Williamson DH. Control of glucose metabolism in isolated acini of the lactating mammary gland of the rat: effects of oleat on glucose utilization and lipogenesis. *Biochemistry J.* 1978; 170(3):609-13.
- Pereira LO, Francischi RP, Lancha Junior AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(2):111-27.
- Lladó I, Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Monjo M, Estrany M, Roca P, *et al.* Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. *Obes Res.* 2002; 10(4):296-305.

23. Araújo GG, Araújo MB, D'Angelo RA, Manchado FB, Mota CSA, Ribeiro C, *et al.* Máxima Fase estável de lactato em ratos obesos de ambos os gêneros. *Rev Bras Med Esporte.* 2009; 15(1):46-9.
24. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, Souza CT, Picardi PK, Faria MC, *et al.* Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol.* 2006; 577(3):997-1007.
25. Flatt JP. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61:952-9.
26. Cesaretti MRL, Kohlmann Jr O. Modelos experimentais de RI e obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(2):90-197.
27. Ropelle ER, Pauli JR, Prada P, Cintra DE, Rocha GZ, Moraes JC, *et al.* Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol.* 2009; 587(Pt10):2341-51.
28. Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Eur J Gastroent Hepatol.* 2005; 17(8):823-6.
29. Himsworth HP, Kerr RB. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clin Sci (London).* 1939; 4:120-52.
30. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32(3):14-23.
31. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008; 118(3):829-38.
32. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 1999; 19(2):221-9.
33. Oosterveer MH, Van Dijk TH, Tietge UJF, Boer T, Havinga R, Stellaard F, *et al.* High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. *PLoS ONE.* 2009; 4(6):e6066. doi:10.1371/journal.pone.0006066.

Recebido em: 8/2/2012
 Versão final em: 3/7/2012
 Aprovado em: 20/8/2012

4.2 Artigo 2: O presente estudo teve como objetivo submeter animais recém-desmamados a uma intensidade de exercício conhecida (80% do limiar anaeróbio -LA) e uma vez que a determinação do LA para ratos recém-desmamados era inexistente na literatura, o presente estudo teve como objetivo padronizar um teste para determinação do LA para este grupo de animais como também de avaliar os efeitos metabólicos decorrentes do exercício físico em diferentes tecidos.

Em fase de submissão – Moura et al., *Exercício físico moderado individualizado desde a infância ate a idade adulta modula o metabolismo de diferentes tecidos de ratos.*

Exercício físico moderado individualizado desde a infância ate a idade adulta modula o metabolismo de diferentes tecidos de ratos

Leandro Pereira de Moura, Amanda Christine da Silva Sponton, Rodrigo Augusto Dalia, Michel Barbosa de Araújo, José Rodrigo Pauli e Maria Alice Rostom de Mello

RESUMO

O presente estudo objetivou, além de padronizar um teste para determinação do limiar anaeróbio de ratos recém-desmamados, avaliar os efeitos do exercício moderado no metabolismo de diferentes tecidos. Para isso, 20 ratos recém-desmamados da linhagem Wistar foram separados em 2 grupos: C: ratos controles que permaneceram inativos ao longo de todo o experimento e T: ratos submetidos a um protocolo de treinamento a 80% do limiar anaeróbio 1h/dia, 5 dias/semana dos 28 aos 90 dias de idade. Primeiramente, estes animais foram submetidos a um teste para determinação do limiar anaeróbio individual pelo protocolo do lactato mínimo e em seguida submetidos ao treinamento. De acordo com nossos achados, foi possível padronizar um teste para determinação da capacidade aeróbio de ratos recém-desmamados e o treinamento físico moderado exerce efeitos modulatórios positivos em diferentes níveis teciduais, tais como: sangue, músculos e tecido adiposo. O valor médio da concentração mínima de lactato (mmol/L), que equivale ao limiar anaeróbio, foi de $5,03 \pm 1,15$, obtido na sobrecarga de (%p.c.) de $8,59 \pm 1,09$. Ao final do experimento foi possível discriminar os seguintes efeitos decorrentes do exercício físico: menor ganho de peso corporal e acúmulo de gordura em diferentes regiões, maior sensibilidade à insulina e menores concentrações séricas de glicose e insulina e aumento do índice HOMA. Em relação ao tecido muscular, foi visto maior captação de

glicose e maior estoque de glicogênio. Portanto, o conhecimento da intensidade de esforço durante o exercício físico é de suma importância para que se tenha respostas objetivas e que o exercício físico realizado de forma moderada (80% do LAn) faz modulações metabólicas positivas ao organismo contribuindo para melhora da sensibilidade à insulina em diferentes tecidos.

Palavras-chaves: Rato recém-desmamado, Exercício físico, tecido muscular, adiposo

INTRODUÇÃO

Nos dias atuais a prática regular de exercício físico para o tratamento e/ou prevenções de várias patologias tais como: obesidade, diabetes mellitus tipo 1(DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), desnutrição, entre outras tem sido bastante recomendada (ACSM, 2012). Isto devido ao fato de que o exercício físico além de aumentar gasto energético e contribuir para hipotrofia do tecido adiposo (Hunter et al 2010), tecido este que tem sido fortemente relacionado com inúmeras doenças (Després 2012, Johnson, Milner and Makowski, 2012), gera também hipertrofia do tecido muscular o que aumenta a taxa metabólica de repouso elevando o dispêndio energético diário (Campos et al, 2012).

O exercício físico pode proporcionar melhoria na homeostase glicêmica devido a ação do tecido muscular. Em situações de repouso, receptores de membrana localizados na superfície externa do tecido possuem forte afinidade com o hormônio insulina. Uma vez ocorrida a interação hormônio com seu receptor específico, uma cascata de sinalizações é iniciada culminando na fosforilação dos transportadores de glicose 4 (glucose transporter - GLUT4), uma proteína que facilita a entrada de glicose para a célula (Watson & Pessin,

2006; Leto & Saltiel, 2012). Durante esse processo de transmissão de sinais entre proteínas da via de sinalização da insulina, ocorre a fosforilação em tirosina-quinase dessas proteínas e assim o sinal é passado a diante. Caso ocorra fosforilação em serina de alguma dessas proteínas ocorrerá a interrupção dessa passagem de sinal e assim, não há a translocação dos GLUTs para a periferia da célula, diminuindo a facilitação da entrada de glicose para o meio intracelular culminando em hiperglicemia (Flamment M, Hajdouch E, Ferré P, Fougère F 2012).

Desde 1887, quando Chauveau e Kaufman relataram que o tecido muscular, através de sua contração, poderia auxiliar na homeostase glicêmica por conseguir, sem intermédio da insulina, captar glicose circulante, estudos relacionando a papel da contração muscular na homeostase glicêmica veem sendo bastante estudados (Chauveau & Kaufman, 1887). Em 1972, Froberg mostrou que apenas uma única sessão de exercício físico pode promover efeitos benéficos para o metabolismo glicídico e Karlsson et al., (1974) mostraram que esses efeitos gerados pelo exercício possuem respostas transitórias e assim, a prática regular faz com que estes efeitos não cessem.

Uma vez que a prática regular de exercício físico é indicada, o conhecimento da intensidade de esforço durante esta prática é de suma importância. Nos dias atuais há inúmeros trabalhos que mostram variadas respostas, desde nível molecular, celular e fisiológico, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, encontradas em detrimento somente da diferença na intensidade trabalhada (Pinho et al., 2012, Johannsen et al., 2012, Nyberg et al., 2012). Visto isso, o presente estudo objetivou além de padronizar um teste para determinação do limiar anaeróbio de ratos recém-desmamados,

analisar os efeitos de um protocolo de exercício moderado de caráter aeróbio (80% do limiar anaeróbio) na modulação metabólica de ratos desde o desmame até a idade adulta.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos recém-desmamados da linhagem Wistar, com 21 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 (cinco ratos por gaiola), e mantidos à temperatura ambiente de 21° C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, alimentados com ração balanceada padrão Purina e água “*ad libitum*”.

ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Os protocolos foram submetidos à apreciação e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Biociências, da UNESP – Campus de Rio Claro (Protocolo: 4573/2010).

GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir dos 28 até aos 90 dias de idade os animais foram divididos em dois grupos: Controle (C): ratos que permaneceram sedentários ao longo de todo o experimento e Treinado (T): ratos submetidos a um protocolo de treinamento de natação ao longo de todo o experimento.

ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO

Os animais do grupo submetido ao treinamento foram adaptados ao meio líquido. A adaptação consistiu em manter o animal em água rasa a uma temperatura de $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com isso minimizar o estresse sofrido pelos animais perante o meio líquido.

DETERMINAÇÃO DO LIMAR ANAERÓBIO PELO TESTE DE LACTATO MÍNIMO

O teste de lactato mínimo foi realizado aos 28, 50 e 70 dias de idade para a determinação do limiar anaeróbio dos animais dos grupos treinados, conforme proposto para humanos (JONES; DOUST, 1998; TEGTBUR et al., 1993), modificado para ratos (VOLTARELLI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2007, MELLO et al., 2010). Este teste envolveu: a) um período breve de exercício de alta intensidade para provocar um aumento de lactato sanguíneo circulante; b) um período de breve recuperação para assegurar níveis altos de lactacidemia e c) um protocolo de teste de exercício com cargas progressivas, com coleta de sangue para análise de lactato a cada carga. Uma vez que a porção progressiva do teste de lactato mínimo começa quando as concentrações de lactato sanguíneo são altas, o teste progressivo produz um perfil de lactato sanguíneo característico, em forma de “U”. O lactato mínimo sanguíneo foi definido como a intensidade de exercício na qual a “curva em forma de U”, derivada dos valores de lactato sanguíneo obtidos durante o teste, atinge o nadir e, teoricamente, indica o LAn (TEGTBUR et al., 1993). Partindo desse conceito de lactato mínimo, alguns estudos foram realizados para adaptar este teste às condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2007,

MELLO et al., 2010). O protocolo empregado, descrito a seguir, mostrou-se exequível e foi utilizado no presente estudo.

Para indução da hiperlactacidemia, os animais foram colocados individualmente em tanques (100 X 80 X 80cm) contendo água a $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$, suportando sobrecargas elevadas em relação ao peso corporal (20% aos 28 dias, 13% aos 50 e 70 dias de idade) e nadaram durante 30 segundos. Após 30 segundos de repouso, foram submetidos novamente à natação com as mesmas cargas até a exaustão. Após um período de repouso (12min aos 28 dias e 9min aos 50 e 70 dias de idade), foram coletadas amostras de sangue através de corte na extremidade da cauda, para a determinação da concentração de lactato e os animais iniciaram exercício de natação com intensidades progressivamente maiores (ARAÚJO et al., 2007, modificado por MELLO et al., 2010). A primeira carga equivale a 5% p.c. aos 28 dias e 4% p.c. aos 50 e 70 dias, sendo acrescida de 1,0% p.c aos 28 dias e 0,5% p.c aos 50 e 70 dias a cada 5 minutos, até a exaustão do animal. A cada troca de carga, foi coletada amostra de sangue para dosagem de lactato. A determinação das concentrações sanguíneas de lactato foi efetuada pelo método enzimático (ENGEL & JONES, 1978).

Uma vez que é frequentemente assumido que o LAn é caracterizado pela maior intensidade de exercício em que lactato sanguíneo não aumenta mais que 1mmol/L entre o 10º e o 30ºmin de exercício com carga constante (MADER & HECK, 1986), três dias depois da realização dos testes de lactato mínimo, os ratos foram submetidos à natação suportando cargas constantes correspondentes a LSM. Cada teste consistiu em natação contínua por 30min com 100% da carga encontrada no teste de lactato mínimo, com coletas de

sangue a cada 10min para determinação do lactato, a fim de se confirmar a estabilização (VOLTARELLI et al., 2002).

PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Do desmame (28 dias de idade) à idade adulta (90 dias de idade) os animais dos grupos treinados foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a 31 ± 1 °C, uma hora por dia, cinco dias por semana, suportando sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, equivalentes à 80% do LAn individual, identificado pelo teste de lactato mínimo.

AVALIAÇÕES *IN VIVO*

Ao início do experimento (28 dias de idade) e ao final (90 dias de idade) os animais foram pesados e submetidos ao teste de tolerância a insulina (TTI).

Teste de tolerância à insulina - TTI

Ao início (28 dias de idade) e ao final do experimento (90 dias de idade), a sensibilidade à insulina foi avaliada através do teste de tolerância à insulina (TTI). Uma primeira coleta de sangue foi feita através de um corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de insulina, na dose de 150 mU/100g de peso, foi administrada via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas após 4, 8, 12 e 16 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose, utilizando kits comerciais (Laborlab®). Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. Os resultados foram analisados pelo cálculo da taxa de remoção da glicose sérica (Kitt). O kitt foi calculado pela fórmula $(0,0693/t_{1/2}) \times 100$ e expresso em %/minuto. A remoção da glicose sanguínea ($t_{1/2}$) foi

calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue nos momentos de decaimento após a administração de insulina (LUNDBAEK 1962) utilizando *software Microsoft Excel 2007*.

OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Sangue

Ao final do experimento, em estado alimentado e 48 horas depois da última avaliação "in vivo" os animais foram sacrificados, após anestesia com CO₂ e em repouso de 72 horas, sendo o sangue coletado para a separação do soro e dosagem de glicose e insulina (Laborlab[®])

Determinação do Índice Homa

Turner e colaboradores desenvolveram um modelo matemático que prediz a sensibilidade à insulina pela simples medida da glicemia e insulina de jejum (Matthews et al., 1985). Este método foi chamado de HOMA e dele se extrai o índice HOMA-IR, que visa traduzir a sensibilidade à insulina. Eles se basearam em dados da literatura para construir curvas relacionando glicemia e estado de homeostase (em inglês: stady-state plasma glucose, ou SSPG), com a resposta insulínica. Em resumo, o modelo prediz uma insulinemia e glicemia para uma sensibilidade à insulina. Inversamente, se conhecidas simultaneamente a glicemia e a insulinemia, o modelo pode fornecer o índice Homa-IR pela seguinte equação:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mMol)} \times \text{insulina (Mu/mL)} \div 22,5$$

Pâncreas

O pâncreas foi extirpado por inteiro para pesagem e foi macerado e utilizado para a determinação da concentração de insulina (Malaisse, Malaisse-Lagae, & Wright, 1967).

Músculo Gastrocnêmio

Ao início (28 dias de idade) e ao final do experimento (90 dias de idade) o músculo gastrocnêmico foi extirpado para posterior determinação da concentração de triglicerídeos intramuscular utilizando kit comercial (Laborlab[®]) e um lote separado de animais (n=6 animais/grupo), que recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente, foi sacrificado 60 minutos após receberem administração intraperitoneal de 3mCi $^3\text{H}_2\text{O}$. Alíquotas do tecido muscular gastrocnêmico foram extraídas e pesadas para determinação da taxa de lipogênese, utilizando-se água triciada, como previamente descrito por Robinson & Williamson, 1978. A taxa de síntese de lipídios foi expressa em μmol de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporada em lipídios por hora, por grama de tecido.

Aos 90 dias de idade a determinação da concentração de glicogênio no músculo gastronêmio foi realizada (SJÖRGREEN et al 1938; Dubois et al., 1956).

Músculo sóleo

Após o sacrifício, o músculo sóleo foi removido. A seguir, fatias com peso entre 25 e 35 mg desse músculo foram submetidas ao procedimento de incubação descrito por Mello et al 2001, modificado visando a avaliação da captação de glicose. As fatias foram colocadas em frascos de cintilação contendo 1,5 ml de tampão Krebs-Ringer bicarbonato e submetidos a 30

minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubinoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/5%). Após esse período, as fatias do músculo foram transferidas para novos frascos de cintilação (frasco externo), em cujo interior foram instalados pequenos tubos em forma de concha (frasco interno) com uma haste reta de aproximadamente 3 cm de comprimento que se insere nas tampas de borracha do frasco externo. Cada frasco externo continha 1,5ml de tampão Krebs-Ringer e cada frasco interno 700µl de hiamina 10x. Após 60 minutos de incubação nesse sistema, com gaseamento durante os 15 primeiros minutos, foram adicionados 100µl de ácido tricloroacético (TCA) 25% ao frasco externo visando a liberação de CO₂. A preparação foi mantida por mais 3 horas no sistema. Decorrido esse tempo, 200µl do líquido contido no frasco interno foram retirados para a determinação do CO₂ produzido. A temperatura na pré-incubação e incubação foi de 37°C. O tampão Krebs-Ringer, base dos meios de pré-incubação e incubação, constituiu de: NaCl 06%, HEPES 6,64mM, KCl 0,032%, CaCl₂ 1,14mM, KH₂PO₄ 0,015%, NaHCO₃ 0,19%, MgSO₄ 0,03%. A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O₂/CO₂ (95%/5%) e o pH ajustado a 7,4. A esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura. Ao meio de pré-incubação foi adicionado piruvato de sódio para a concentração de 5mM. Ao meio de incubação, foi adicionada glicose (5,5mM) contendo [U-14C] glicose (0,25 mCi/µl), [3H] 2-deoxyglicose (2DG = 0,5 mCi/µl) e insulina (100 mUI/µl). Feitas as adições, o pH foi ajustado a 7,4 e os meios transferidos para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37°C sob gaseamento em O₂/CO₂ (95%/5%) durante pelo menos 15 minutos. Foi

avaliada a captação de glicose, utilizando-se a 2-DG como marcador, medindo-se a radioatividade do ^{14}C da glicose contidas.

Tecido adiposo

Ao início (28 dias de idade) e ao final do experimento (90 dias de idade) o tecido adiposo das diferentes regiões (subcutânea, mesentérica, retroperitoneal e epididimal) foi removido de acordo com descrição de Cinti 2005, para pesagem total e determinação das concentrações de triglicerídeos. As concentrações de triglicerídeos nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira et al., 1990.

Um lote separado de animais (n=6 animais/grupo), que recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente, foi sacrificado 60 minutos após receberem administração intraperitoneal de $3\text{mCi } ^3\text{H}_2\text{O}$. Alíquotas do tecido adiposo da região mesentérica foram extraídas e pesadas para determinação da taxa de lipogênese, utilizando-se água triciada, como previamente descrito por Robinson & Williamson, 1978. A taxa de síntese de lipídios foi expressa em $\mu\text{mol de } ^3\text{H}_2\text{O}$ incorporada em lipídios por hora, por grama de tecido.

ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O teste-t de student para amostras independentes foi empregado para a comparação entre as médias ao início e ao final do experimento. O nível de significância pré-estabelecido foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foi possível determinar o limiar anaeróbio para ratos recém-desmamados. O valor médio da concentração de mínima de lactato (mmol/L) foi de $5,03 \pm 1,15$, obtido na sobrecarga de (%p.c.) de $8,59 \pm 1,09$ (Figura 1A). Durante uma sessão de 30min de exercício físico com os animais suportando 100% da sobrecarga encontrada no teste de lactato mínimo, houve estabilização da concentração periférica de lactato entre o 5º e o 30º min de exercício (Figura 1B).

Figura 1A

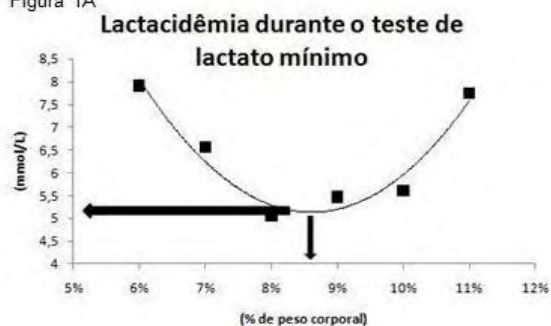
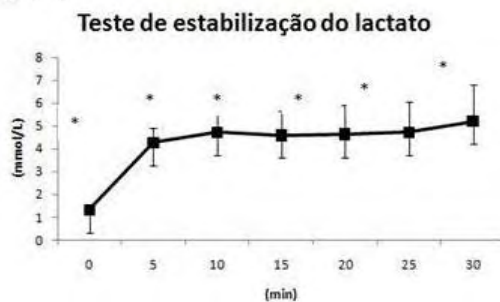


Figura 1B



Com o intuito de estabelecer uma homogeneidade inicial entre os grupos, uma linha de base ao começo do experimento (28 dias de idade) foi realizada. Foi possível mostrar que ambos os grupos, ao início do experimento, não apresentavam diferenças entre si, caracterizando assim a homogeneidade entre eles desde massa corporal à aspectos bioquímicos (Tabela I).

Tabela I. Dados referentes aos dados coletados ao início do experimento (28 dias de idade).

Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento

	Sedentário	Treinado
<i>In vivo</i>	Controle	Treinado
Peso (g)	97,45 $\pm$ 15,42	95,20 $\pm$ 13,32
Kitt (taxa de remoção/min)	2,77 $\pm$ 1,42	2,48 $\pm$ 0,83
<i>Pós morte</i>		
Glicemia (mg/dL)	126,96 $\pm$ 13,48	138,73 $\pm$ 19,55
Insulinemia (ng/mL)	0,21 $\pm$ 0,21	0,21 $\pm$ 0,10
Insulina Pâncreas (μg/g)	406,26 $\pm$ 112,86	520,76 $\pm$ 210,71
<i>Concentração de triglicerídeos</i>		
Músculo Gastrocnêmio (mg/g)	0,32 $\pm$ 0,20	0,30 $\pm$ 0,11
Tecido Adiposo Mesentérico (mg/g)	5,99 $\pm$ 0,83	5,90 $\pm$ 1,33
Tecido Adiposo Epididimal (mg/g)	3,76 $\pm$ 1,89	4,01 $\pm$ 1,06
Tecido Adiposo Subcutâneo (mg/g)	14,80 $\pm$ 3,60	14,06 $\pm$ 2,72
Tecido Adiposo Retroperitoneal (mg/g)	13,84 $\pm$ 11,06	9,95 $\pm$ 6,55
<i>Atividade Lipogênica</i>		
Músculo Gastrocnêmio	1621,64 $\pm$ 261,31	1586,10 $\pm$ 123,01
Tecido Adiposo Mesentérico	882,52 $\pm$ 235,05	1032,85 $\pm$ 151,89

(n=5/grupo). Test t de student.

Ao final do período experimental, os animais foram pesados e submetidos ao teste de tolerância à insulina. Foi possível discriminar o menor ganho de peso corporal dos animais submetidos ao protocolo de treinamento físico, bem como sua maior sensibilidade à insulina (Figura 2A e 2B).

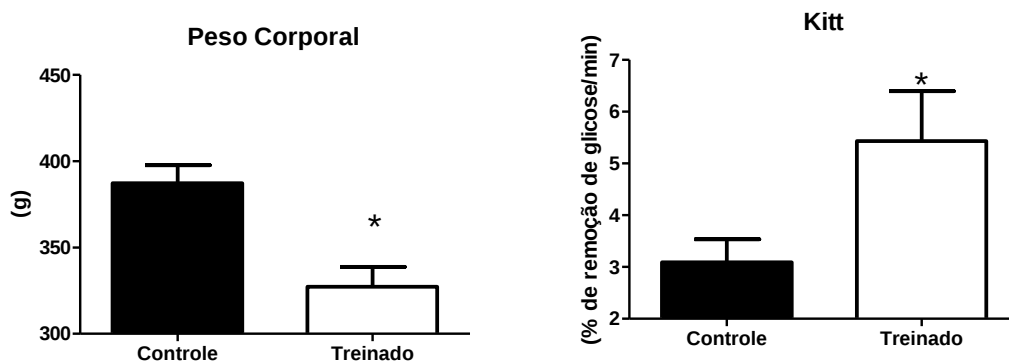


Figura 2A e 2B. Dados referentes ao peso corporal e ao Kitt obtido através do teste de tolerância à insulina ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento ($n=5/\text{grupo}$). Test t de student.

Após o sacrifício, as gorduras localizadas em diferentes regiões (mesentérica, subcutânea, retroperitoneal e epididimal) foram removidas para pesagem total. O treinamento físico foi capaz de reduzir o peso corporal dos animais (Figura 2A), bem como as quantidades de estoque em todas as regiões corporal e a síntese de lipídeos na gordura mesentérica (Figura 3A, 3B, 3C e 3D).

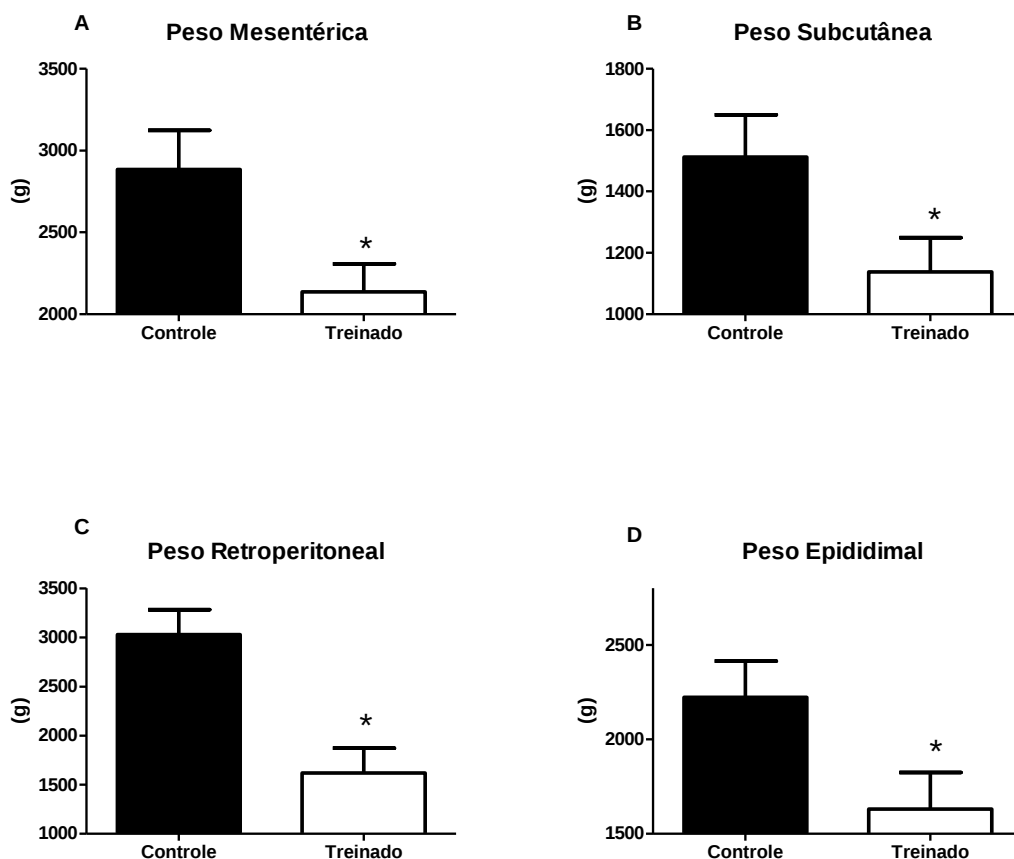


Figura 3A, 3B, 3C e 3D. Peso em gramas das gorduras removidas em diferentes regiões (mesentérica, subcutânea, retroperitoneal e epididimal) ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento ($n=5/\text{grupo}$). Test t de student.

O sangue foi coletado para determinação das concentrações de glicose e de insulina séricas e posterior cálculo do índice HOMA. Logo após, o tecido pancreático foi extirpado para determinação das concentrações de insulina. O treinamento físico reduziu níveis de glicose sérica e de insulina, tanto sérica quanto pancreática, culminando aumento do índice de resistência à insulina HOMA (Figura 4A, 4B, 4C e 4D).

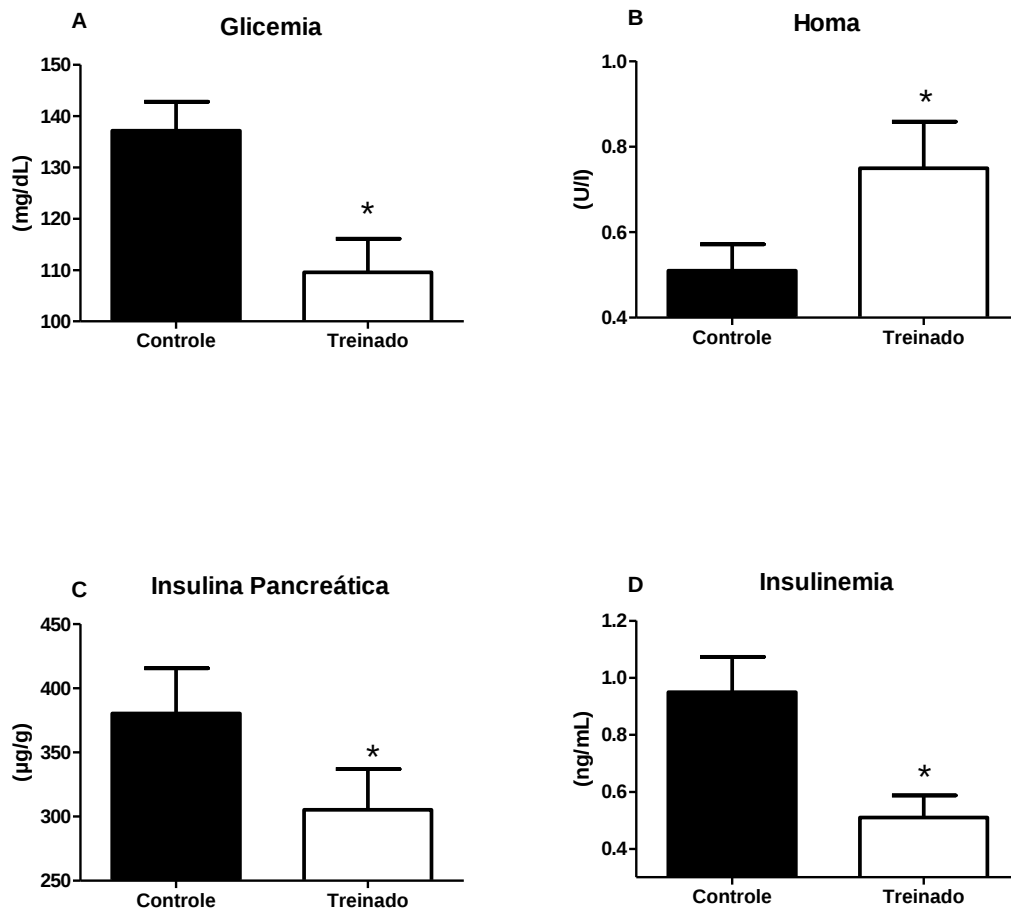


Figura 4. A: Glicose sérica, B: índice HOMA, C: Concentração de insulina pancreática e D: insulina sérica ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento (n=5/grupo). Test t de student.

No músculo gastrocnêmio, a atividade lipogênica foi determinada assim como a quantidade de gordura e de glicogênio armazenada no próprio tecido. O treinamento físico não foi eficiente em alterar atividade lipogênica nem concentrações de triglicerídeos, mas foi encontrado maior estoque de glicogênio neste tecido (Figura 5A, 5B e 5C).

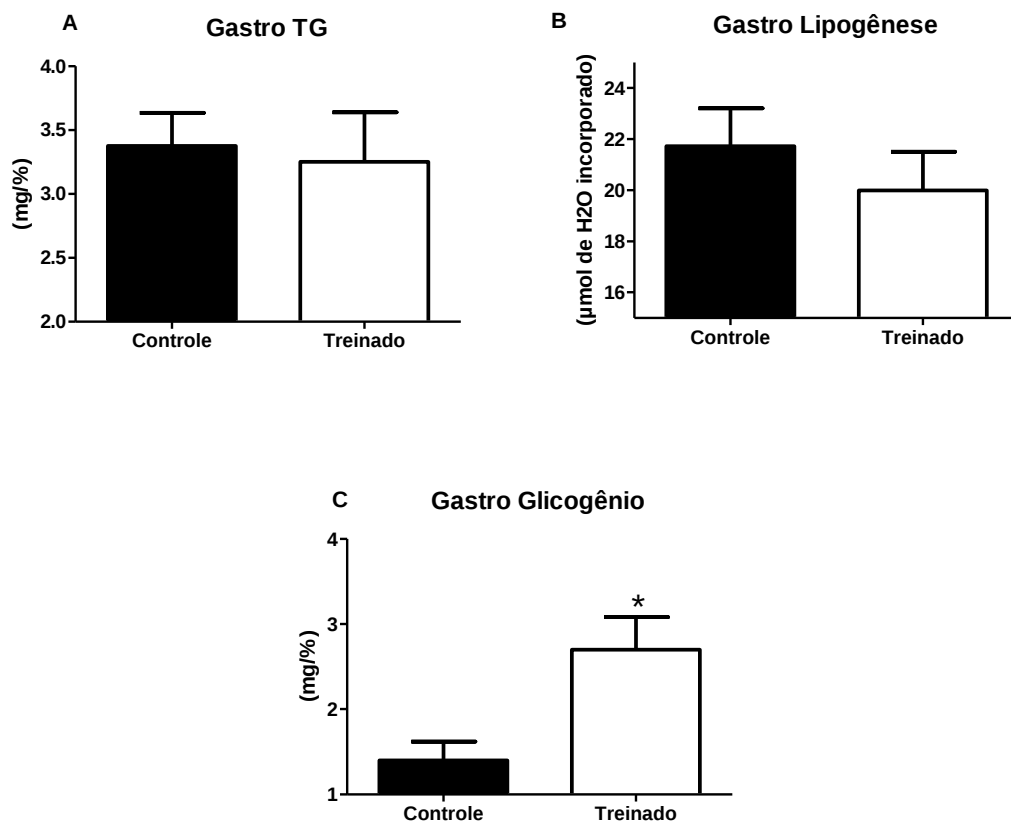


Figura 5. A: Concentração de triglicerídeos estocada, B: Atividade lipogênica e C: Concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento (n=5/grupo). Test t de student.

A captação de glicose pelo músculo sóleo foi aumentada pelo protocolo de treinamento ao final do período experimental (Figura 6).

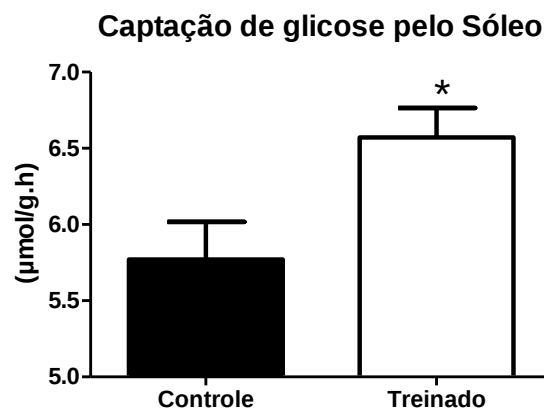


Figura 6. Captação de glicose pelo músculo sóleo ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão no início do experimento (n=5/grupo). Test t de student.

DISCUSSÃO

A inatividade física é considerada uma das principais causas de obesidade e uma vez que esta doença vem crescendo de forma alarmante, tornando-se uma pandemia, estudos relacionados a sua prevenção e/ou tratamento são de suma importância. O presente estudo, objetivou padronizar um teste onde uma única sessão de exercício fosse suficiente para determinar o limiar anaeróbio desses animais além de analisar, os efeitos do treinamento físico moderado em modular diferentes tecidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Pode-se concluir que a prática regular de exercício físico moderado iniciado precocemente pode prevenir as alterações negativas causadas tanto pelo sedentarismo como também pelo envelhecimento.

Inicialmente, o minucioso conhecimento da intensidade de exercício físico a ser trabalhada é de suma importância. Há inúmeros estudos que mostram respostas distintas do organismo frente a diferentes intensidades de exercício físico (PINHO et al., 2012, JOHANNSEN et al., 2012, NYBERG et al., 2012) . De acordo com Dubé et al., (2011), existe alta correlação dose/resposta da intensidade do exercício físico vs sensibilidade à insulina vs recuperação de indivíduos após acidente vascular cerebral (HORNBY et al., 2011) vs infarto agudo do miocárdio (BENETTI et al., 2011) e vs fibromiálgicos (DE BRUJIN et al., 2011). Esses autores mostraram também que quanto mais bem trabalhada a intensidade melhor será a resposta do organismo frente ao exercício. Portanto, fazem-se necessários a precisa determinação e o conhecimento da

capacidade aeróbia do indivíduo previamente à exposição da prática de exercício físico.

Para a determinação do limiar anaeróbio o teste de Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) é considerado padrão ouro, mas requer **de** vários dias de testes e em algumas situações especiais, sua aplicação é bastante limitada. Diante disso, em 1993, Tegtbur et al., desenvolveram um teste para determinação do Limiar Anaeróbio (Lan) denominado teste do lactato mínimo. Este teste considera a intensidade de exercício correspondente ao ponto de equilíbrio entre a produção e a remoção do lactato sanguíneo (TEGTBUR et al., 1993; CAMPBELL, 1998; BAILIKIAN JUNIOR et al., 2001; SIMÕES, 2002) ou MFEL (BACON & KERN, 1999; MacINTOSH et al., 2002). Além de este protocolo ter sido considerado um método válido para se determinar a capacidade aeróbia, foi considerado também um protocolo que permite identificar a intensidade correspondente à MFEL em apenas uma sessão de teste (CAMPBELL, 1998; BACON & KERN, 1999; TEGTBUR et al., 2001; MacINTOSH et al., 2002; SIMÕES, 2002; SIMÕES et al., 2004).

Por outro lado, estudos dos efeitos metabólicos do exercício em ratos são frequentemente questionados pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Por essa razão, Gobatto et al., (2001) adaptaram o teste de MFEL de humanos para ratos Wistar adultos e, uma vez sabendo que é possível adaptar testes ergogênicos de humanos para animais, Voltarelli et al., (2002) e Araújo et al., (2007) adaptaram o teste de lactato mínimo também para ratos Wistar adultos em exercício de natação. Estes autores sugerem que independentemente da sobrecarga encontrada pelo teste, a concentração de lactato sanguíneo mínimo é

encontrada próximo de 5mmol/L. Por outro lado, como a aplicação de sobrecargas para ratos durante o exercício na água se faz em relação ao peso corporal, estes testes podem parecer inadequados para ratos muito leves ou em fase de crescimento acelerado, como ratos recém-desmamados. Contudo, o presente estudo obteve êxito em determinar o limiar anaeróbio em ratos recém-desmamados, corroborando com os dados anteriormente descritos por Gobatto et al., (2001), Voltarelli et al., (2002) e Araújo et al., (2007) em ratos adultos onde os autores verificaram que a concentração de lactato no LAn, independentemente da intensidade obtida, foi próximo de 5mmol/L.

Após a padronização do teste de lactato mínimo de ratos recém-desmamados, uma vez que é frequentemente assumido que o LAn é caracterizado pela maior intensidade de exercício em que lactato sanguíneo não aumenta mais que 1mmol/L desde o 10º até 30ºmin de exercício com carga constante (MADER & HECK, 1986), quatro dias após a realização dos testes de lactato mínimo, os ratos foram submetidos à natação suportando cargas constantes correspondentes à encontrada no teste, constatou-se que o comportamento do lactato ocorreu de forma semelhante ao encontrado no teste de MFEL, podendo assim o teste de lactato mínimo, realizado em apenas um único teste, ser uma importante ferramenta na determinação do LAn para ratos recém-desmamados.

Estudos relacionando as negativas consequências de um estilo de vida sedentário não tem sido novidade no meio científico, sabe-se que nos dias atuais há grande disponibilidade de calorias em forma de alimento. A grande oferta e o respectivo consumo dessas calorias tem sido acima do necessário, esta abundância calórica unida à economia energética, causada pela vida

moderna, contribui fortemente para a evolução das alterações que desencadeiam a obesidade (Bramble & Lieberman, 2004). Uma das principais alterações no organismo frente ao ganho de peso é o estado de resistência à insulina (RI). A RI é um estado onde o organismo fica resistente à ação do hormônio, gerando quadro de hiperinsulinemismo e que quando não tratado pode levar à falência das células beta pancreáticas e consequentemente à diabetes tipo 2 (DM2) (Ma, 2012).

Há vários estudos que mostram a relação direta entre o acúmulo de tecido adiposo e a resistência à insulina, sugerindo que quanto maior o acúmulo de gordura maior será a resistência do organismo ao hormônio. Durante a resistência à insulina há o maior acúmulo de tecido adiposo por gerar resistência primeiramente a nível hipotalâmico e assim aumentando ingesta alimentar que causará maior disponibilidade de caloria ao tecido adiposo que será o último a ser atingido.

No presente estudo o treinamento físico foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal e consequentemente, os estoques de gorduras de todas as regiões analisadas (mesentérica, epididimal, subcutânea e retroperitoenal), e, através de uma análise um pouco mais sensível à síntese de tecido adiposo na região mesentérica, a atividade lipogênica, foi possível verificar que animais submetidos ao exercício apresentaram menor síntese de lipídeos. O menor ganho de massa adiposa pelo grupo treinado pode ser devido ao fato de o exercício físico quando realizado em intensidade moderada e por não necessitar de energia de forma rápida, ativa a enzima lipase hormônio sensível que por sua função aumenta lipólise e assim disponibilizando substrato energético para a atividade realizada (Achten e Jeukendrup (2004). Outro fator

que pode ter colaborado para menor acúmulo de massa gorda foi a diminuição nas concentrações insulina, hormônio este que participa de forma direta da lipogênese. De acordo com os achados do presente estudo, a redução de massa gorda colaborou para melhora no metabolismo de carboidratos e gerou ambiente favorável para melhor sensibilidade à insulina frente aos tecidos periféricos conforme demonstrado pelo teste de sensibilidade à insulina e pela análise do índice HOMA.

A primeira atuação do tecido adiposo frente a RI é o aumento da atração de monócitos principalmente o MCP-1 (Proteína de quimio atração por monócitos) que se tornarão macrófagos e conseqüentemente irão produzir maiores quantidade de proteínas pró-inflamatórias. O tecido adiposo atua como um órgão metabólico endócrino dinâmico que secreta adipocinas inflamatórias que irão contribuir para que toda a via de sinalização da insulina seja danificada e que tenha a interrupção da transdução de sinais culminado na diminuição da fosforilação da AKT bem como a diminuição do deslocamento dos GLUTs 4 para a periferia e assim minimizando a entrada de glicose na célula. Uma importante adipocina secretada pelo tecido adiposo é o TNF- α que pode atuar diretamente nesta via de sinalização e indiretamente ativando a via da JNK (*c-jun-N-terminal kinase*) que também diminui a propagação do sinal da insulina por mecanismos que interferem na fosforilação do receptor de insulina e dos seus substratos (IRS-1 e IRS-2) (Hotamisligil *et al.*, 1996; Hirosumi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Wellen & Hotamisligil, 2005), este sinal inflamatório também pode desacoplar o complexo IKK/I κ B/NF κ B que irá contribuir para o aumento da produção de proteínas pró-inflamatórias por atuar no núcleo da célula e aumentar RNA mensageiros dessas proteínas inflamatórias e também

este desacoplamento permite o início da ubiquitinação proteica intracelular (Hayden & Ghosh, 2008).

Outro papel danoso desempenhado pelo tecido adiposo é o de oferecer maiores concentrações de ácidos graxos para a circulação. De acordo com Boden & Shulman 2002, os AG séricos também podem interferir de modo negativo na via de sinalização da insulina, isto porque os AG séricos, principalmente os de cadeia média (12, 14 e 16 carbonos) possuem forte afinidade pelos recém-descobertos receptores TLR4 (*Toll-like receptor 4*) que são receptores de membrana relacionados ao sistema imune que podem desencadear a fosforilação da JNK, IKK e iNOS, ou seja, AGs de cadeia média podem ter a mesma atuação do TNF- α a nível sérico e celular.

A RI quando não tratada faz com que maiores concentrações de insulina sejam produzidas e secretadas, podendo assim desencadear a falência das células beta pancreática (Ma, 2012). Ao final do presente experimento, quando a glicemia, insulina sérica e pancreática e o índice HOMA foram analisados foi visto que ou o sedentarismo ou o envelhecimento ou a união dessas duas variáveis, fez com que o estado semelhante ao de RI e pré-diabetes fosse instalado nos animais do grupo controle. O envelhecimento unido a inatividade física pode colaborar no desenvolvimento da resistência à insulina por proporcionar maior ganho de massa adiposa e diminuição da massa magra tanto em humanos como em animais (Rocha et al., 2003; Rimbert et al., 2004; Amati et al., 2009). Visto isso, a prática regular de exercício físico vem sendo bastante indicada para a prevenção e/ou tratamento dessa doença (Tuomilehto et al., 2001; Misra et al., 2008; Janiszewski & Ross 2009; Pauli et al., 2010), uma vez que esta prática além de gerar gasto energético para o organismo,

produz interleucina-6 (IL-6), esta interleucina consegue minimizar os transtornos inflamatórios causados pelo excesso de tecido adiposo desde níveis periféricos bem como a nível central (Petersen & Pedersen, 2005; Ropelle et al., 2010). Em 2003, Starkie et al., (2003) estudaram a relação do exercício físico e IL-6, os autores mostraram que após infusão da bactéria *Escherichia Coli* em humanos, o exercício físico foi capaz de diminuir o aumento de níveis séricos de TNF- α e quando aliado a infusão de IL-6 a elevação foi ainda menor.

Além do exercício físico contribuir para melhor sinalização de proteínas envolvidas no metabolismo dos carboidratos e lipídeos a contração muscular também possui efeito positivo na captação de glicose independente de insulina. Em 2005, Jessen & Goodyear sugeriram que a contração muscular pode contribuir para entrada de glicose na célula por reduzir níveis de ATP e fosfocreatina e assim, uma enzima chamada AMP-ativada cinase é fosforilada e esta irá transmitir sinais para translocação do GLUT 4. Uma outra via que pode ser ativada a partir da contração muscular e assim colaborar para captação glicêmica sem a atuação da insulina é através do complexo Calcio-calmodulina. A contração muscular gera diferencial de voltagem na membrana despolarizando a célula, isto acarreta na abertura dos canais de Ca^{++} , gerando a ativação do complexo cálcio-calmodulina e aumento no conteúdo de Adenosina Monofosfato (AMP); esta, por sua vez, tem a função de segundo mensageiro que transmite o sinal que fará com que o GLUT-4 **se** transloque para a periferia da membrana (SALTIEL E KAHN 2001; GOODYEAR; KAHN,1998; JESSEN; GOODYEAR, 2005; RITCHER et al, 2004; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001).

A insulina também atua no metabolismo lipídico muscular. Este hormônio é um agente anabólico que colabora na síntese de triacilgliceróis fazendo o transporte da estrutura base de TG para dentro das células, os α -glicerolfosfatos. No presente estudo, quando o tecido muscular gastrocnêmico foi analisado, nenhuma alteração na síntese nem na concentração armazenada em forma de triglicerídeos foi encontrada, mostrando assim a otimização da maquinaria de oxidação dos lipídios, uma vez que mesmo com menor estímulo à síntese lipídica decorrente da menor concentração de insulina para o grupo treinado, este grupo manteve seus estoques energéticos desde lipídeos à glicogênio inalterados.

O glicogênio é principal reserva energética muscular (Roach, 2002), durante a prática de exercício físico a qual gera dispêndio energético a glicose desempenha uma importante função de suprir o organismo com energia. A energia provinda da glicose é uma energia de forma rápida, portanto sua utilização será diretamente proporcional a intensidade de exercício físico sustentada, quanto mais intensa ou longa a potência externa a ser suportada maior será a ativação da glicogênio fosforilase e assim, maior disponibilidade de glicose intracelular para ser oxidada (Romijn et al., 1993). A depleção de glicogênio é uma tática largamente usada por atletas, uma vez que após sua depleção, próxima de 80%, um quadro chamado de supercompensação de glicogênio é instalado e assim permitindo ao atleta maior acúmulo desse substrato desde a nível muscular à cerebral em relação a situação inicial e assim melhorando seu desempenho em provas (Hawley et al., 1997; Matsui et al., 2012).

Essa supercompensação eleva os valores de glicogênio acima dos valores basais e ainda não foi totalmente compreendida no meio científico. Inicialmente credita-se na melhor atuação da insulina frente aos tecidos periféricos que após a prática de exercício físico a entrada de glicose à célula é facilitada devido ao maior deslocamento dos GLUTs4 para a periferia (Jessen & Goodyear, 2005; Rose & Richter, 2005; Jesen & Richter, 2012) e assim aumentando níveis de glicose-6-fosfato intracelular que irá estimular desde a atividade da glicogênio sintetase (Jesen & Richter 2012) como também de sua síntese através da glicogenina (Sheare et al., 2005) e diminuir a atividade da glicogênio fosforilase (Sandström et al., (2004).

Este melhor funcionamento da via da insulina desencadeado pela prática do exercício físico, ficou bem elucidado no trabalho quando se associa o maior acúmulo de glicogênio com a maior captação de glicose muscular. Ao final do experimento, fatias do músculo sóleo foram retiradas e colocadas em meio de incubação com insulina e glicose a níveis basais mostrando que mesmo sem um maior aporte de glicose pós-depleção há maior captação desse substrato em decorrência do exercício físico

Visto isso, Irimia et al., (2012) concluem que a supercompensação do glicogênio requer uma cadeia coordenada de eventos em dois níveis, inicialmente pelo aumento da capacidade de fosforilação de glicose pelo músculo e em segundo um aguçado controle das enzimas envolvidas diretamente na síntese (glicogênio sintetase) e degradação do glicogênio (glicogênio fosforilase). No presente estudo, os animais treinaram em intensidade moderada por 1 hora / dia a 80% do LAn e nesta intensidade a oxidação dos carboidratos é responsável por 70-80% do total do dispêndio

energético e que de acordo com Loy et al., (1986) e Tsintzas et al., (1996) e Sano et al., (2012) nesta intensidade ocorrerá a depleção de glicogênio suficiente para que após a sessão de exercício o período de supercompensação seja instalado, podendo perdurar por dias (Arnall et al., 2007).

Portanto, após analisar os dados descritos acima é possível afirmar que o conhecimento da intensidade a ser suportada durante o exercício físico é de suma importância para que se tenha respostas objetivas e que o exercício físico realizado de forma moderada (80% do LAn) faz modulações metabólicas positivas ao organismo contribuindo para melhora da sensibilidade à insulina em diferentes tecidos.

CONCLUSÃO

De acordo com nossos achados, é possível concluir que a prática regular de exercício físico modula de maneira positiva o metabolismo de diferentes tecidos sendo essencial para uma melhora na qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

1. BODEN, G. SHULMAN, GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. ***Europ J Clin Invest.*** 32(3):14–23, 2002; <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.2002.32.issue-s3/issuetoc>.
2. HAYDEN, MS. GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. ***Cell.*** 132:344–362, 2008.
3. MA, ZA. The role of peroxidation of mitochondrial membrane phospholipids in pancreatic β -cell failure. ***Curr Diabetes Rev.*** Jan;8(1):69-75, 2012.
4. JENSEN, TE. RICHTER, EA. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. ***J Physiol.*** Mar 1;590(Pt 5):1069-76, 2012.
5. ROSE, AJ & RICHTER, EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? ***Physiology (Bethesda).*** 20:260–270, 2005.
6. JESSEN, N & GOODYEAR, LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. ***J Appl Physiol.*** 99:330–337, 2005.
7. ARNALL, DA. NELSON, AG. QUIGLEY, J. LEX, S. DEHART, T. FORTUNE, P. Supercompensated glycogen loads persist 5 days in resting trained cyclists. ***Eur J Appl Physiol.*** Feb;99(3):251-6, 2007.
8. SANO, A. KOSHINAKA, K. ABE, N. MORIFUJI, M. KOGA, J. KAWASAKI, E. *et. al.* The effect of high-intensity intermittent swimming on post-exercise glycogen supercompensation in rat skeletal muscle. ***J Physiol Sci.*** Jan;62(1):1-9, 2012. doi: 10.1007/s12576-011-0170-y.

9. LOY, SF. CONLEE, RK. WINDER, WW. NELSON, AG. ARNALL, DA. FISHER, AG. Effects of 24-hour fast on cycling endurance time at two different intensities. **J Appl Physiol.** 61(2):654-9, 1986.
10. TSINTZAS, OK. WILLIAMS, C. BOOBIS, L. GREENHAFF, P. Carbohydrate ingestion and single muscle fiber glycogen metabolism during prolonged running in men. **J Appl Physiol.** 81(2):801-9, 1996.
11. ROMIJN, JA. COYLE, EF. SIDOSSIS, LS. GASTALDELLI, A. HOROWITZ, JF. ENDERT, E. *et. al.* Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. **Am J Physiol. (Endocrinol Metab)** 265 (3 Pt 1): E380-91, 1993.
12. MATSUI, T. ISHIKAWA, T. ITO, H. OKAMOTO, M. INOUE, K. LEE, MC. *et. al.* Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. **J Physiol.** Feb 1;590(Pt 3):607-16, 2012.
13. IRIMIA, JM. ROVIRA, J. NIELSEN, JN. GUERRERO, M. WOJTASZEWSKI, JFP. CUSSÓ, R. Hexokinase 2, glycogen synthase and phosphorylase play a key role in muscle glycogen supercompensation. **PLoS One.** 7(7):e42453, 2012.
14. SANDSTROM, ME. ABBATE, F. ANDERSSON, DC. ZHANG, SJ. WESTERBLAD, H. *et. al.* Insulin-independent glycogen supercompensation in isolated mouse skeletal muscle: role of phosphorylase inactivation. **Pflugers Arch.** 448:533–538, 2004.
15. SHEARER, J. WILSON, RJ. BATTRAM, DS. RICHTER, EA. ROBINSON, DL. *et. al.* Increases in Glycogenin and glycogenin mRNA accompany glycogen resynthesis in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 289:E508–E514, 2005.

16. GREIWE, JS. HICKNER, RC. HANSEN, PA. RACETTE, SB. CHEN, MM. *et al.* Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. **J Appl Physiol.** 87: 222–226, 1999.
17. ROACH, PJ. Glycogen and its metabolism. **Curr Mol Med.** 2:101–120, 2002.
18. HAWLEY, JA. SCHABORT, EJ. NOAKES, TD. DENNIS, SC. Carbohydrate-loading and exercise performance. An update. **Sports Med.** 24:73–81, 1997.
19. NIELS, J. & GOODYEAR, LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J Appl Physiol.** 99:330–337, 2005.
20. STARKIE, R. OSTROWSKI, SR. JAUFFRED, S. FEBBRAIO, M. PEDERSEN, BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. **FASEB J.** May;17(8):884-6, 2003.
21. FLAMMENT, M. HAJDUCH, E. FERRÉ, P. FOUFELLE, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab.** Aug;23(8):381-90, 2012.
22. WATSON, RT. & PESSIN, JE. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. **Trends Biochem Sci.** 31:215-222, 2006.
23. LETO, D. & SALTIEL, AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** June;13:383-396, 2012. doi:10.1038/nrm3351
24. ROPPELLE, ER. FLORES, MB. CINTRA, DE. ROCHA, GZ. PAULI, JR. MORARI J. *et. al.* IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol.** Aug;24:8(8), 2010. pii: e1000465.

25. PETERSEN, AM. PEDERSEN, BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**. 98:1154–1162, 2005.
26. MALAISSE, WJ. MALAISSE-LAGAE, F. WRIGHT, PH. Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. **American Journal of Physiology**. 213:4, 1967.
27. BRAMBLE, DM. & LIEBERMAN, DE. Endurance running and the evolution of Homo. **Nature**. 432:345-352, 2004.
28. CUSHMAN, SW. GOODYEAR, LJ. PILCH, PF. RALSTON, E. GALBO, H. PLOUG, T. *et. al.* Molecular mechanisms involved in GLUT4 translocation in muscle during insulin and contraction stimulation. **Adv Exp Med Biol**. 441:63-71, 1998.
29. ROSENBERGER, M. Sedentary behavior: target for change, challenge to assess. **International Journal of Obesity Supplements**. July;2:S26-S29, 2012.
30. MELLO, MAR. SOUZA, CT. BRAGA, LR. SANTOS, JW. RIBEIRO, IA. GOBBATTO, C. A. Glucose tolerance and insulin action in monosodium Glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. **Physiol Chem Phys and Med. NMR** 33:63-71, 2001.
31. SJÖRGREEN, B. NORDENSKJOLD, T. HOLMGREN, H. WOLLERSTROM, J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. **Pflugers Arch. Gesante Physiol. Menschen Tiere**. 240-247, 1938.
32. DUBOIS, B. GILLES, KA. HAMILTON, JK. REBERS, PA. Calométric method for determination of sugar and relate sustances. **Anal Chem**. 28:350-356, 1956.

33. HUNTER, GR. BROCK, DW. BYRNE, NM. CHANDLER-LANEY, PC. DEL CORRAL, P. GOWER, BA. Exercise Training Prevents Regain of Visceral Fat for 1 Year Following Weight Loss. **Obesity**. 18(4):690–695, 2010.
34. DESPRÉS, JP. Abdominal Obesity and Cardiovascular Disease: Is Inflammation the Missing Link? **Can J Cardiol**. Aug10, 2012. [Epub ahead of print]
35. JOHNSON, AR. MILNER, JJ. MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunol Rev**. Sep;249(1):218-38, 2012.
36. CAMPOS, EZ. BASTOS, FN. PAPOTI, M. FREITAS JUNIOR, IF. GOBBATTO, CA. BALIKIAN JUNIOR, P. The effects of physical fitness and body composition on oxygen consumption and heart rate recovery after high-intensity exercise. **Int J Sports Med**. Aug;33(8):621-6, 2012.
37. HOLMES, BF. SPARLING, DP. OLSON, AL. WINDER, WW. DOHM, GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289: E1071–1076, 2005.
38. LYSENKO, V. JONSSON, A. ALMGREN, P. PULIZZI, N. ISOMAA, B. TUOMI, T. *et al.* Clinical Risk Factors, DNA Variants, and the Development of Type 2 Diabetes. **N Engl J Med** 359:2220-32, 2008.
39. MISRA, A. ALAPPAN, NK. VIKRAM, NK. GOEL, K. GUPTA, N. *et al.* Effect of supervised progressive resistance-exercise training protocol on insulin sensitivity, glycemia, lipids, and body composition in Asian Indians with type 2 diabetes. **Diabetes Care** 31:1282–1287, 2008.

40. TUOMILEHTO, J. LINDSTROM, J. ERIKSSON, JG. VALLE, TT. HAMALAINEN, H. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N Engl J Med**. 344:1343–1350, 2001.
41. JANISZEWSKI, PM. & ROSS, R. The Utility of Physical Activity in the Management of Global Cardiometabolic Risk. **Obesity**. 17:S3–S14, 2009. doi:10.1038/oby.2009.382.
42. GLEESON, M. BISHOP, NC. STENSEL, DJ. LINDLEY, MR. MASTANA, SS. NIMMO, MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**. September;11:607-615, 2011. doi:10.1038/nri3041
43. PAULI, JR. ROPELLE, ER. CINTRA, DE. CARVALHO-FILHO, MA. MORAES, JC. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinaseB/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J. Physiol**. Jan;15:586(2):659-71, 2008.
44. PAULI, JR. ROPELLE, ER. CINTRA, DE. SOUZA, CT. SILVA, ASR. MORAES, JC. et. al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mechanisms of Ageing and Development** 131:323–329, 2010.
45. KARLSSON, J. NORDESJO, LO. SALTIN, B. Muscle glycogen utilization during exercise after physical training. **Acta Physiol Scand**. Jan;90(1):210-217, 1974.
46. FROBERG, SO. Effects of training and of acute exercise in trained rats. **Metabolism**. Nov;20(11):1044-51, 1971.

4.3 Artigo 3: Com o intuito de estabelecer uma linha de base na metade do período experimental (90 dias de idade), o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico aeróbio moderado no acúmulo de gordura hepática de ratos sedentários e treinados.

Submetido – Moura LP et al. *Moderate Physical Activity from Childhood Contributes to Metabolic Health and Reduces Hepatic Fat Accumulation in Adult Rats. The International Journal of Behavioural Nutrition and Physical Activity (Online), 2013.*

Moderate Physical Activity from Childhood Contributes to Metabolic Health and Reduces Hepatic Fat Accumulation in Adult Rats

Leandro Pereira de Moura¹ (leandropereiram@hotmail.com)

Amanda Christine da Silva Sponton¹ (amanda_sponton@yahoo.com.br)

Michel Barbosa de Araújo¹ (mbujo@ig.com.br)

Rodrigo Augusto Dalia¹ (rodrigodalia@yahoo.com.br)

José Rodrigo Pauli² (rodrigose@ yahoo.com.br)

Maria Alice Rostom de Mello¹ (mellomar@rc.unesp.br)

1: São Paulo State University – UNESP/Rio Claro, Bioscience Institute, Physical Education Department.

2: Campinas State University – UNICAMP/Limeira, Applied Sciences Faculty, Sports Science Course.

Corresponding Author:

Leandro Pereira de Moura

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24ª n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Department of Physical Education - Rio Claro, Zip code: 13506-900, SP, Brazil.

E-mail: leandropereiram@hotmail.com

Abstract

Background: Obesity, by triggering insulin resistance, may contribute to the accumulation of hepatic fat, and this accumulation by lipotoxicity can lead the organ to fail. Because obesity is growing at an alarming rate and, worryingly, in a precocious way, the present study aimed to investigate the effects of moderate physical training performed from childhood to adulthood on liver fat metabolism in rats. **Methods:** Twenty rats that were 28 days old were divided into two groups: control (C) and trained (T). The C Group was kept in cages without exercise, and the T group was submitted to swimming exercise for 1 hour/day, 5 days/week from 28 to 90 days of age (8 weeks) at 80% of the anaerobic threshold determined by the lactate minimum test. At the end of the experiment, the body weight gain, insulin sensitivity (glucose disappearance rate during the insulin tolerance test), concentrations of free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG) and hepatic lipogenic rate were analyzed. For the statistical analysis, the Student t-test was used with the level of significance preset at 5%. **Results:** The T group showed lower body weight gain, FFA concentrations, fat accumulation, hepatic lipogenic rate and insulin resistance. **Conclusion:** The regular practice of moderate physical exercise from childhood can contribute to the reduction of obesity and insulin resistance and help prevent the development of accumulation of hepatic fat in adulthood.

Keywords: Moderate Exercise, Metabolic Health; Hepatic Fat Accumulation.

Background

Obesity is a major public health problem and is a risk factor for the development of many fatal diseases, particularly type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1-4]. The prevalence of NAFLD in obese individuals increases significantly, reaching 50-75% [5]. The increase in the prevalence of NAFLD is presumed to parallel the increased prevalence of obesity and diabetes in all age groups.

Discovered by Ludwig and colleagues in 1980 [6], NAFLD is clinically characterized by the deposition of fat droplets in liver hepatocytes [5,7] and varies from simple macrovesicular steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis and cirrhosis. NAFLD may be the main cause of morbidity and mortality related to liver diseases, with the potential to progress to liver failure. However, it should be noted that the progression to fibrosis or cirrhosis appears to occur only in patients with evidence of steatohepatitis.

The etiopathogenesis of DGHNA includes insulin resistance and a consequently increased synthesis of triglycerides and retention in the hepatocyte, leading to macrovesicular steatosis. Mitochondrial dysfunction also assumes an important role, leading to lower lipid oxidation and contributing to fat accumulation and injury in hepatocytes. The attack of the organ also involves oxidative stress, causing peroxidation of membrane lipids in the hepatocytes and cytokine production, especially of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which are partly responsible for the progression of hepatic steatosis to steatohepatitis and cirrhosis [5,7].

Currently, there are no drugs to treat this disease, and decreased fat intake and regular exercise are recommended for people diagnosed with NAFLD [8-9]. The change in lifestyle should occur as soon as possible because obesity in childhood and adolescence is a major risk factor for obesity and its co-morbidities in adulthood, including NAFLD [10-11]. Therefore, investigating whether physical exercise during childhood can prevent the development of obesity and NAFLD and determining the appropriate intensity become important.

Due to the limitations of human studies, lab animals are commonly used in scientific research, and the ability to control the intensity of exercise performed by these animals in adulthood has been extensively investigated. However, there are special situations, such as weanling rats that simulate children, that have not yet been elucidated in the literature. Insufficient information is also available on the effects induced by

moderate exercise performed from childhood to adulthood. Therefore, this study aimed to investigate the effects of moderate exercise training (80% of the individual anaerobic threshold) performed from childhood to adulthood on liver fat metabolism in rats.

Materials and methods

Animals

This study included 30 weanling Wistar rats, 21 days old at the beginning of the experiment, from the Central Animal Facility of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu/SP, Brazil. The animals were housed in polyethylene cages measuring 37cm x 31cm x 16cm (four rats per cage) and kept under a room temperature of 21 °C and photoperiod of 12 hours light/dark. The rats were fed with standard Purina feed and water "ad libitum".

All animal experiments were performed in accordance with the Brazilian law for the scientific use of animals (Law No 11.794, of October 8, 2008). The protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) from the Institute of Biosciences, UNESP - Campus de Rio Claro (Protocol: 4573/2010).

Experimental Groups

The rats were randomized, from 21 to 90 days old, into two groups: sedentary (S) rats that remained inactive and did not perform physical exercise and trained (T) rats that were subjected to an exercise protocol of swimming at a moderate physical intensity of 80% of the individual anaerobic threshold (AT).

Adaptation to water

All animals in group T were adapted to the water environment. The adaptation consisted of keeping the animal in shallow water at a temperature of 31 ± 1 °C and thereby minimizing the stress experienced by the animals in the aquatic environment.

Determination of anaerobic threshold (AT)

At 28 days of age, after being adapted to the liquid environment, the AT of the T group rats was determined by the minimum lactate test, as proposed for humans [12] and modified for rats[13-14]. This test consists of the following: a) a brief period of high intensity exercise to cause an increase in the circulating blood lactate, b) a brief period of recovery to ensure high levels of lactacidemia, c) exercise with progressive loads, increasing overhead and d) the collection of blood for the lactate analysis. Because the progressive portion of the lactate minimum test begins when the blood

lactate concentrations are high, the test produces a characteristic progressive lactate profile in the form of a "U". The minimum blood lactate was defined as the intensity of exercise in which the "U curve", derived from the blood lactate values obtained during the test, reaches a minimum concentration and theoretically indicates the AT [12].

For the hyperlactacidemia induction, the animals were placed individually in tanks (100 X 80 X 80 cm) containing water at 31 ± 1 °C, supporting high overloads relative to the body weight (bw) (20% at 28 days of age and 13% for adult rats) and allowed to swim for 30 seconds. After 30 seconds of rest, the rats were allowed to swim again with the same overloads until exhaustion. After a resting period (12 min for 28 day old rats and 9 min for adult rats), blood samples were collected by cutting the tail end to determine the lactate concentration, and the animals began the swimming exercise with progressively higher intensities [13-14]. The first load was equivalent to 5% bw at 28 days of age and 4% bw in adult rats, and the loads were increased by 1.0% bw in 28 day old rats and 0.5% bw in adult rats every 5 minutes until exhaustion of the animal. In each overload exchange, a blood sample was collected for lactate determination [13 modified by 14]. The blood lactate determination was performed by the enzymatic method [15].

Because the AT is often assumed to be characterized by high-intensity exercise in which the blood lactate does not increase more than 1 mmol/L from 10 to 30 min of exercise with constant overload [16], four days after the completion of the lactate minimum test, the rats were submitted to a single session of swimming supporting constant overloads corresponding to the lactate threshold (AT) that was determined by the test. Each test consisted of continuous swimming for 30 minutes with a 100% load with blood sampling in every 10 min to confirm the stabilization of lactate production.

Training protocol

The T group was submitted to swimming exercise in individual tanks containing water at 31 ± 1 °C for one hour per day, five days per week, for eight weeks (from 28 to 90 days of age). The rats supported overloads tied to the back with elastic (Flash elastic, São Paulo/SP, Brazil®), equivalent to 80% of the individual AT previously identified by the lactate minimum test.

3.7. Insulin tolerance test (ITT)

At the end of the experiment, the insulin sensitivity was evaluated by the insulin tolerance test (ITT). The first blood sample was taken from the tail vein (time 0). Then,

a solution of insulin at a dose of 150 mU/100 g of body weight was administered intraperitoneally. The blood samples were collected at 4, 8, 12 and 16 minutes post-insulin injection from heparinized capillaries and calibrated for 25 µl to determine the glucose concentrations using a commercial kit (Laborlab ®). A single cut at the tail end was enough to collect all blood samples. The results were analyzed by calculating the removal rate of serum glucose (Kitt). The kitt was calculated by the formula $(0.0693/t_{1/2}) \times 100$ and expressed in %/min. The removal of blood glucose ($t_{1/2}$) was calculated by curve least squares analysis of the blood glucose levels at the times of decay after the administration of insulin [17] using Microsoft Excel software 2007.

Sacrifice of animals and obtaining biological material

Blood

At the end of the experiment, in the fed state and 48 hours after the last "in vivo" evaluation, the animals were sacrificed after anesthesia with CO₂ in a 72 hour resting state, and the blood was collected for serum separation and determination of free fatty acids [18].

Liver

The liver was collected at time of sacrifice for weighing, and an aliquot (500 mg) was used to determine the concentration of triglycerides using a commercial kit (Laborlab ®, Paulínia/SP, Brazil).

In a separate batch of animals (5/group), rats from both groups were sacrificed 60 minutes after receiving the intraperitoneal administration of 3 mCi ³H₂O. Aliquots of the liver tissue were extracted and weighed to determine the lipogenic rate using tritiated water as previously described by Robinson & Williamson [19]. The lipid synthesis rate was expressed as µmol of ³H₂O incorporated per hour per gram of hepatic tissue.

Statistical Analysis

The results were expressed as the means ± standard deviation. The Student t-test for independent samples was used to compare the mean body weight, rate of removal of serum glucose (Kitt), concentrations of FFA and triglycerides and hepatic lipogenic rate at the end of the experiment. The level of significance was preset at $p < 0.05$.

Results

The aerobic capacity for the weanling rats could be determined. The average minimum concentration of lactate (mmol/L) was 5.03 ± 1.15 , and that obtained in the overload (% bw) was 8.59 ± 1.09 (Figure 1A). During a 30 minute exercise session with the animals supporting 100% of the overhead determined by the lactate minimum test, there was stabilization of the peripheral lactate concentration between 10 and 30 min of exercise (Figure 1B).

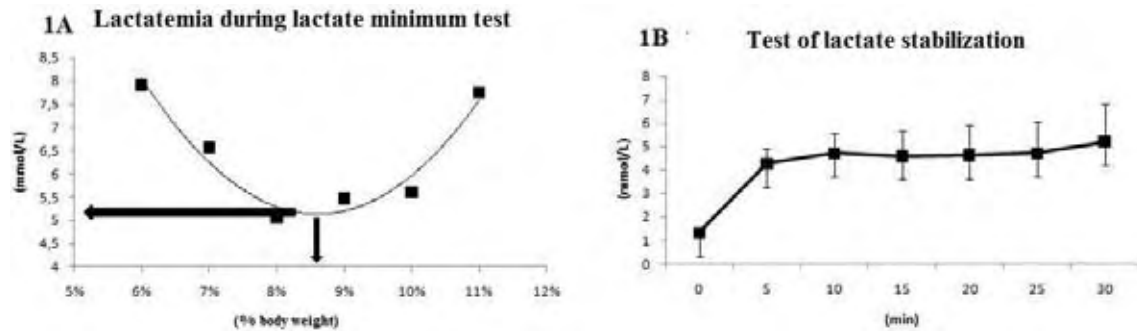
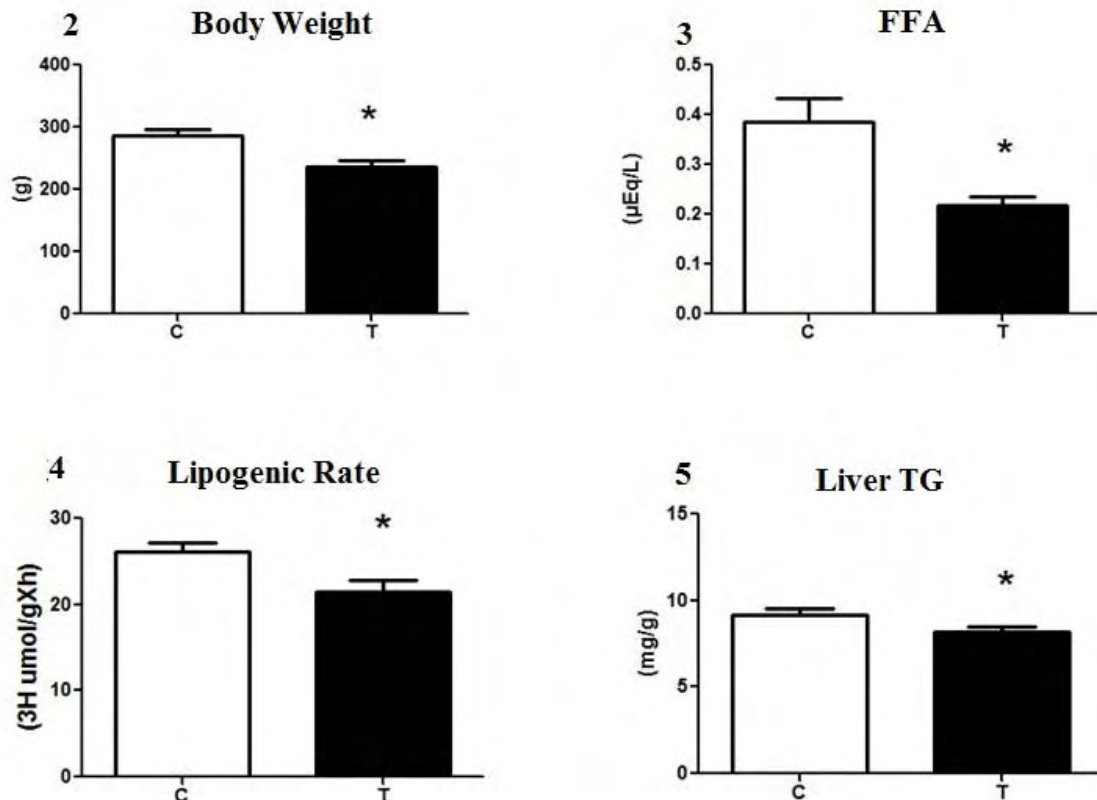


Figure 1A. Determination of the blood lactate threshold (BLT) from a single rat during the incremental swimming test. Each dot indicates the blood lactate concentration (mmol / L) on the ordinate and the work overload on the abscissa. The BLT and workload were calculated with a second-order polynomial curve using Microsoft Excel®. The vertical arrow estimates the workload, and the horizontal arrow estimates the blood lactate concentration.

Figure 1B. Peripheral lactate concentration during exercise with a constant overload, which was estimated by BLT using the minimum blood lactate test. The results are expressed as the means $\pm$ standard deviation of 10 animals. * = different from the baseline (ANOVA, $p < 0.05$).

The animals from the T group showed lower weight gain, free fatty acid and triglycerides concentrations and hepatic lipogenic rate compared with the sedentary group (Figures 2, 3, 4 and 5).



Figures 2, 3, 4, 5. The data on body weight, free fatty acid (FFA) level, liver lipogenic rate and liver triglyceride level, respectively, at the end of the experiment. C = control, T = trained. * $\neq$ T group compared with C. The data represent the means $\pm$ standard deviation (n = 10 animals/group).

The T group animals showed a higher uptake of glucose per minute as measured by the insulin tolerance test (ITT). These animals were more sensitive to insulin than the sedentary group animals (Figure 6).

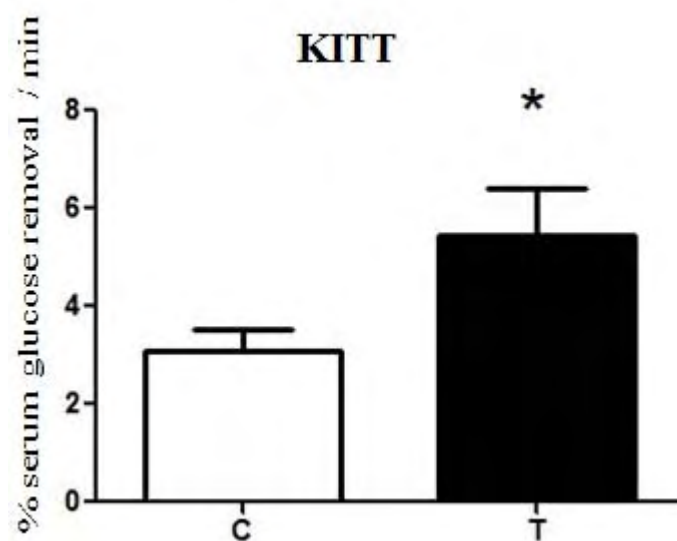


Figure 6. Glucose removal rate after the insulin tolerance test calculated by KITT. C = control, T = trained. * $\neq$ T group when compared with C. The data are represented as the means $\pm$ standard deviation (n = 10 animals/group).

Discussion

Cases of liver carcinomas are the fifth most common in the global ranking of cancer diagnoses [20], growing in line with the growth of NAFLD [21-22]. Because the latter disease may be due to the insulin resistance found in obese individuals and because the incidence of obesity has been increasing worldwide, affecting children, youths and adult men and women [23], the importance of the prevention and treatment of obesity, which can be initiated in childhood by physical exercise, is important to minimize the inconvenience caused by this condition in adulthood.

Because the current findings surrounding the effect of moderate physical exercise (80% of $\dot{V}_{O_{2max}}$) on the development of NAFLD are not clear, the present study examined the effect of a protocol of moderate training (80% of individual aerobic capacity) from childhood to adulthood on fat metabolism in the liver.

A thorough knowledge of the appropriate exercise intensity is of paramount importance. There are numerous studies that show different responses of an organism to different intensities of exercise [24-26]. According to Dubé et al. [27], there is a high correlation between the dose/response of physical exercise intensity with insulin sensitivity, with the recovery of individuals after stroke [28] or acute myocardial infarction [29] and with fibromyalgia [30]. These authors also showed that the higher the intensity of exercise, the better the body's response to that exercise. Therefore, a precise determination of the individual aerobic capacity prior to start of a physical training program is important.

To determine the aerobic capacity, the maximum lactate steady state (MLSS) test is considered the gold standard, but it requires several days of tests, and its application can be limited in some special cases. Therefore, in 1993, Tegtbur et al. [12] developed a test to determine the anaerobic threshold (AT) called the lactate minimum test, which has been considered a method to determine the exercise intensity corresponding to the equilibrium between the production and removal of blood lactate [12,31] or MLSS [32-33]. In addition to this protocol being considered a valid method to determine aerobic capacity, it also enables the identification of the intensity corresponding to the MLSS in a single test session [32-34].

Moreover, studies of the metabolic effects of exercise in rats are often challenged by a lack of information about the intensity of the effort performed by the

animal during exercise. Therefore, Gobatto et al. [35] adapted the MLSS test from human adults to Wistar rats, and after understanding that human tests could be adapted to animal models, Araujo et al. [13] adapted the lactate minimum test for adult Wistar rats in swimming exercise. These authors suggested that regardless of the overload in the test, the minimum blood lactate concentration was approximately 5 mmol/L. Because the application of overloads to rats during exercise in the water is relative to body weight, these tests may appear inappropriate for rats that are too light or in an accelerated growth phase, such as weanling rats. However, this study successfully determined the AT in weanling rats, which was previously unknown in the literature. This study also confirmed the data previously described by Gobatto et al. [35] and Araújo et al. [13], which showed that the lactate concentration at AT, regardless of the intensity obtained, was approximately 5 mmol/L.

After standardization of the lactate minimum test because the AT is often assumed to be characterized by a higher intensity of exercise in which the blood lactate does not oscillate more than 1 mmol/L from 10 to 30 min of exercise with a constant overload [16], four days after the lactate minimum test, the rats were submitted to exercise with constant overloads corresponding to those found in the test. The lactate behavior was similar to that found in the MLSS test, and thus the lactate minimum test can be an important tool to determine the AT for weanling rats in a single test.

The exercise intensity in cases of obesity and fat accumulation in the liver is a matter that has much been discussed currently because if the sustained intensity is high, there is a high fat oxidation during the exercise session. However, to restructure the organization for the future to sustain wear, this oxidation is increased after this practice, a condition known as excess post-exercise oxygen consumption (EPOC) in which the consumption is directly related to the intensity supported during the physical exertion; thus, the greater the exercise intensity, the greater the oxygen consumption as long as this condition persists [36-37].

When exercise is performed with the intensity ranging from mild to moderate, during which the energy demand is not required quickly, there will be time enough to metabolize the fatty acids (FA) used to feed this energy demand, and thus there will be a greater activation of the enzyme lipoprotein lipase. In turn, there will be an increase in the rate of lipolysis, and the FAs from adipose tissue will predominantly be oxidized to

sustain exercise for a long time, causing a consequent decrease in fat mass and fat intake by the liver. This area of work is known as Fatmax [38-39].

In 2010, Da Silva et al. [40] showed that the intensity of exercise performed at 70% of AT decreased insulin resistance due to a decrease in inflammatory processes and also showed that rats swimming freely, without an overload but for a long period (6 hours), had improvements in insulin sensitivity. These results indicated that very light exercise can be compensated for by increasing the volume of exercise. However, this high volume training may not be able to be supported by obese individuals, especially in those activities that require the body weight to be supported, indicating that training protocols with shorter durations are important.

A study performed by Lima et al. [41], in which the effects of different exercise intensities in type 2 diabetic subjects were analyzed, revealed that diabetic patients who consumed high carbohydrate solutions oxidized even more fat compared with healthy subjects after high-intensity exercise (90% Lan). This protocol can improve insulin sensitivity and minimize the damage caused by insulin resistance in obese individuals.

If the exercise intensity is not known, the exercise can act as a villain in combating obesity. According to Mayer et al. [42], when exercise is performed at a very low intensity that is not accompanied by a decrease in hunger, the body mass can increase. According to these authors, the effect of physical exercise on satiety occurs at intense levels, in which elevated levels of catecholamine suppress the feeling of hunger. In this study, subjecting the animals to a moderate-intensity exercise (80% of AT) caused these animals to have a lower weight gain, leading to a lower amount of adipose tissue and thereby reducing the intake of fat by the liver, ultimately preventing the development of NAFLD.

The stored energy in the form of fat can act in a toxic way on the liver and lead to lipotoxicity of the liver [43] and even organ failure by activating apoptotic pathways [44]. Analyzing the accumulation of hepatic fat through the lipogenic rate and triacylglycerol concentrations in the tissue, the insulin resistance was shown to generate a favorable environment for the greater accumulation of hepatic fat, which can be explained by the fact the activation of the lipogenic transcription factor hepatic SREBP (sterol regulatory element-binding proteins) by high concentrations of insulin [45-47]. The state of hyperinsulinemia increases the activity of SREBP in the liver, thereby increasing the levels of lipogenic genes, such as fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC) and Stearoyl-CoA Desaturase1 (SCD1) contributing to the buildup

of hepatic fat. Recently, Cintra et al. [48] showed in mice fed a high-fat diet that regular physical exercise that reduces SREBP levels was also effective in reducing the levels of FAS and SCD1 and increasing the levels of ACC, thereby contributing to the reversal of hepatic steatosis.

Because unsaturated fatty acids can activate proinflammatory pathways through membrane receptors, such as the toll-like receptors (TLRs) [49], reducing the supply of lipid substrates as a result of the increased resistance to insulin-shaped fatty acids is necessary. In this study, moderate physical exercise, by promoting a decrease in concentrations of FFA, was effective in improving insulin sensitivity, which may be associated with increased insulin activity in insulin-sensitive tissues. According to Boden & Shulman [50], the responsiveness of peripheral tissues to insulin may be damaged due to an increase in the concentration of FFA, affecting the insulin signaling pathway and thus leading to type 2 diabetes. Another factor that may have contributed to the best response of the peripheral tissues to insulin was the strong power of muscle contraction, which increases the expression of proteins that participate in the insulin signaling pathway, causing glucose uptake through mechanisms independent of intracellular insulin in rats and mice, whether they are obese or lean, during one or more physical exercise sessions, thereby making the body less glucose-intolerant and insulin-dependent [51-55].

Conclusion

According to our findings, the regular practice of moderate physical exercise beginning in childhood can contribute to the reduction of obesity and insulin resistance and help prevent the development of NAFLD in adulthood.

Abbreviations List

NAFLD: *Nonalcoholic fatty liver disease*; **FFA:** *Free fatty acids*; **TG:** *Triglycerides*; **TNF- α :** *Tumor necrosis factor alpha*; **AT:** *Anaerobic threshold*; **bw:** *Body weight*; **ITT:** *Insulin tolerance test*; **BLT:** *Blood lactate threshold*; **MLSS:** *Maximum lactate steady state*; **EPOC:** *Excess post-exercise oxygen consumption*; **FA:** *Fatty acids*; **SREBP:** *Sterol regulatory element-binding proteins*; **FAS:** *Fatty acid synthase*; **ACC:** *Acetyl-CoA carboxylase*; **SCD1:** *Stearoyl-CoA Desaturase1*; **TLRs:** *Toll-like receptors*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

All of the authors contributed to the study, with regard to not only sample collection but also the preparation of this manuscript. All of the authors have read and approved the final version of this manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technicians at the Biodynamic Laboratory of the Physical Education Department at UNESP Campus Rio Claro, Clarice Sibuya and José Roberto Rodrigues, for their indispensable support and the National Council of Scientific and Technological Development - CNPq, the Foundation for Research Support of São Paulo - FAPESP for the financial support and FUNDUNESP.

References

1. Kopelman P: **Health risks associated with overweight and obesity.** *Obesity reviews* 2007, **8**:13–17.
2. Caldwell SH, et al: **Obesity and hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2004, **127**:97-103.
3. Brunt EM: **Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis.** *Seminars in Diagnostic Pathology* 2005, **22**:330-8.
4. Williams R: **Global challenges in liver disease.** *Hepatology* 2006, **44**:521-6.
5. Angulo P: **Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *The New England Journal of Medicine* 2002, **346**:1221-31.
6. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: **Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.** *Mayo Clinic Proceedings* 1980, **55**:434-8.
7. Sass DA, Chang P, Chopra KB: **Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review.** *Dig Dis Sci* 2005, **50**:171-80.
8. Pardee PE, Lavine JE, Schwimmer JB: **Diagnosis and treatment of pediatric nonalcoholic steatohepatitis and the implications for bariatric surgery.** *Seminars in Pediatric Surgery* 2009, **18**:144-151.

9. Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H: **Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review.** *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009, **48**:587-596.
10. Dietz WH: **Childhood weight affects adult morbidity and mortality.** *Journal of Nutrition* 1998, **128**(2): 411S-414S.
11. Magarey AM, Daniels LA, Boulton TJ, Cockington RA: **Predicting obesity in early adulthood from childhood and parental obesity.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, **27**:505-13.
12. Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM: **Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 1993, **25**(5): 620-627.
13. Araujo GG, Papoti M, Manchado FB, Mello MAR, Gobatto CA: **Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats.** *Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology* 2007, **148**:888-892.
14. Mello MAR et al: **Determination of anaerobic threshold in weanling rats by lactate minimum test.** In: 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2010, Antalya. *Book of Abstracts 15th Annual Congress of the European College of Sport Science 2010*, **15**:171-172.
15. Engels RC, Jones JB: **Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites.** *Analytical Biochemistry* 1978, **88**:475-84.
16. Mader A & Heck H: **A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold.** *International Journal of Sports Medicine* 1986, **7**(1): 45-65.
17. Lundbaek K: **Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus.** *British Medical Journal* 1962, **3**:1057-1513.
18. Regow BJM et al: **Specific determination of free fatty acid in plasm.** *Clinica Chimica Acta* 1971, **31**:187-195.

19. Robinson AM & Williamson DH: **Control of glucose metabolism in isolated acini of the lactating mammary gland of the rat: effects of oleat on glucose utilization and lipogenesis.** *Biochemistry Journal* 1978, **170**:609-613.
20. Jemal FA, Bray MM, Center J, Ferlay E, Ward D, Forman: **Global cancer statistics.** *A Cancer Journal for Clinicians* 2011, **61**: 69–90.
21. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H: **Overweight, obesity, and cancer risk.** *Lancet Oncolog* 2002, **3**:565–574.
22. Calle EEC, Rodriguez K, Walker-Thurmond MJ: **Thun Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** *The New England Journal of Medicine* 2003, **348**:1625–1638.
23. Thompson AL: **Developmental Origins of Obesity: Early Feeding Environments, Infant Growth, and the Intestinal Microbiome.** *American Journal of Human Biology* 2012, **24**(3):350-60.
24. Pinho CA, et al: **Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats.** *Life Sci.* 2012, **9**;90(13-14):553-9.
25. Johannsen NM, et al: **Effect of Different Doses of Aerobic Exercise on Total White Blood Cell (WBC) and WBC Subfraction Number in Postmenopausal Women: Results from DREW.** *Plos One* 2012, **7**(2):e31319. doi:10.1371/journal.pone.0031319.
26. Nyberg M, Jensen LG, Thaning P, Hellsten Y, Mortensen SP: **Role of nitric oxide and prostanoids in the regulation of leg blood flow and blood pressure in humans with essential hypertension: effect of high-intensity aerobic training.** *The Journal of Physiology* 2012, **15**;590(6):1481-94.
27. Dubé JJ, Fleishman K, Rousson V, Goodpaster BH, Amati F: **Exercise Dose and Insulin Sensitivity: Relevance for Diabetes Prevention.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2011, **44**(5):793-9.
28. Hornby TG, et al: **Importance of specificity, amount, and intensity of locomotor training to improve ambulatory function in patients poststroke.** *Top Stroke Rehabil* 2011, **18**(4):293-307.

29. Benetti M, Araujo CLP, Santos RZ: **Aptidão cardiorrespiratória e qualidade de vida pós-infarto em diferentes intensidades de exercício.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2010, **95**(3).
30. De Bruijn ST, et al: **Relevance of physical fitness levels and exercise-related beliefs for self-reported and experimental pain in fibromyalgia: an explorative study.** *Journal of Clinical Rheumatology* 2011, **17**(6):295-301.
31. Balikian JRP, Neiva CM, Denadai BS: **Effect of an acute beta-adrenergic blockade on the blood glucose response during lactate minimum test.** *Journal of Sports Science and Medicine* 2001, **4**(3):257-65.
32. Bacon L & Kern M: **Evaluating a test protocol for predicting maximum lactate steady state.** *Journal of Sport Medicine Physiology & Fitness* 1999, **39**: 300-308.
33. McIntosh BR, Esau S, Svedahl K: **The lactate minimum test for cycling: estimation of the maximal lactate steady state.** *Canadian Journal of Applied Physiology* 2002, **27**(3):232-49.
34. Tegtbur U, Machold H, Meyer H, Storp D, Busse MW: **Determining the extent of intensive physical performance in patients with coronary heart disease.** *Zeitschrift fur Kardiologie* 2001, **90**(9):637-45.
35. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E: **Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise.** *Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology* 2001, **130A**: 21-7.
36. Gaesser GA & Brooks GA: **Metabolic bases of excess post-exercise oxygen consumption: a review.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 1984, **16**(1):29-43.
37. Bahr R & Sejersted OM: **Effect of feeding and fasting on excess postexercise oxygen consumption.** *Journal of Applied Physiology* 1991, **71**(6):2088-93.
38. Achten J, Gleeson M, Jeukendrup A: **Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2002, **34**:92-97.
39. Achten J & Jeukendrup AE: **Maximal fat oxidation during exercise in trained men.** *International Journal of Sports Medicine* 2003, **24**: 603-608.

40. Da Silva AS, et al: **Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2010, **42**(12):2180-8.
41. Lima LCJ, et al. **Efeito da intensidade do exercício sobre a oxidação de carboidratos e gorduras durante a recuperação pós-exercício em diabéticos tipo 2.** *Revista Brasileira de Ciência e Movimento* 2011, **19**(1):32-41.
42. Mayer J, Marshall NB, Vitale JJ, Christensen JH, Mashayekhi MB, Stare FJ: **Exercise, food intake, and body weight in normal rats and genetically obese adult mice.** *American Journal of Physiology* 1954, **177**:544–548.
43. Unger RH. **Minireview: weapons of lean body mass destruction—the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome.** *Endocrinology* 2003,**144**(12):5159–5165.
44. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ: **Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis.** *J Biol Chem* 2006, **281**(17):12093–12101.
45. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD: **Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus.** *The Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**:30028-32.
46. Horton ES: **Metabolic aspects of exercise and weight reduction.** *Medicine & Science in Sports & Exercise* 1985, **18**:10-18.
47. Ferre P & Foufelle. **Fator de transcrição-SREBP e homeostase lipídica: perspectiva clínica.** *Hormone Research* 2007, **68**:72-82.
48. Cintra DE, et al: **Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c.** *Life Sciences* 2012, **91**:395–401.
49. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. **A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(10):2062–2068.

50. Boden G & Shulman GI: **Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction.** *European Journal of Clinical Investigation* 2002, **32**(3):14–23.
51. Luciano, E. et al: **Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway.** *European Journal Endocrinology* 2002, **147**:149-157.
52. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT, Ropelle ER: **New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2009, **53**(4):399-408.
53. Matos A, et al: **Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice.** *Acta Physiologica* 2010, **198**(1):61-9.
54. Pauli JR, et al: **Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle.** *Mechanisms of Ageing and Development (Print)* 2010, **131**:323-329.
55. Oliveira AG, et al: **Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats.** *Diabetes* 2011, **60**(3):784-96.

4.4 Artigo 4: Após o período experimental, o presente estudo objetivou em avaliar as alterações do treinamento e sua cessação em animais alimentados com dieta controle.

Em fase de submissão: Moura LP et al., Alterações decorrentes do treinamento físico e destreinamento na saúde metabólica e acúmulo de gordura no fígado.

Alterações decorrentes do treinamento físico e destreinamento na saúde metabólica e acúmulo de gordura no fígado

Leandro P. de Moura¹, Amanda C. Sponton¹, Michel B. de Araújo¹, Rodrigo A. Dalia¹, José Rodrigo Pauli², Maria Alice R. de Mello¹.

1. São Paulo University State (UNESP), Rio Claro - SP, Brazil.
2. Campinas University State (UNICAMP), Limeira - SP, Brazil

Resumo

Tanto o sedentarismo bem como o envelhecimento são fatores importantes no desenvolvimento da Diabetes tipo 2, podendo assim contribuir com o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A prática regular de exercício físico tem sido bastante recomendada para prevenção e tratamento de distúrbios metabólicos, mas os efeitos decorrentes da cessação desta prática ainda não estão bem elucidados pela literatura. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do treinamento e destreinamento físico em ratos. Para isso, ratos Wistar (21 dias de idade) foram utilizados e divididos em 3 grupos: Grupo Sedentário (GS): animais que permaneceram sedentários ao longo de todo o experimento; Grupo Treinado (GT): animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento ao longo de todo o experimento e Grupo Destreinado (GD): animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento até a metade e após isso, foram mantidos sedentários até ao final do experimento. O treinamento consistiu de treinamento aeróbio (80% do limiar anaeróbio – identificado a cada 20 dias de experimento) 1h/dia, 5dias/semana por 16 semanas para o GT e 8 para o GD. Ao final do experimento variáveis séricas, adiposas e hepáticas foram analisadas. Foi visto que o treinamento físico reduziu a área sob a curva de insulina durante o teste de tolerância à glicose, o ganho de peso, reduziu a atividade lipogênica da gordura mesentérica, concentração de triglicerídeos e o estoque de gorduras em diferentes regiões e que sua cessação neutraliza esses benefícios advindos do exercício físico.

Palavras-chaves: Exercício Físico, Saúde Metabólica e Acúmulo de Gordura Hepática.

Introdução

Por não proporcionar gasto calórico e estar correlacionado com aumento da ingestão de alimento e assim contribuindo para o ganho de peso, estudos apontam o sedentarismo como importante fator no desenvolvimento da Diabetes tipo 2 (Kriska et al. 1993; Mayer-Davis et al. 1998; Gustat et al. 2002), podendo assim contribuir com o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A DHGNA engloba alterações hepáticas que pode variar desde o acúmulo de gordura e podendo se evoluir até à cirrose hepática (Tiniakos, Vos, Brunt, 2010). Esta doença é caracterizada pela presença de gotículas de gordura no fígado (Diehl et al., 1999) e foi descoberta por Ludwig e colaboradores em 1980 (Ludwig et al., 1980). A DHGNA vem crescendo de forma alarmante em todo o mundo, atingindo cerca de 30% da população adulta (Stefan, Kantartzis, Häring 2008), esse aumento na incidência da DHGNA vem sendo diretamente relacionada com sedentarismo, resistência à insulina e obesidade (Tiniakos, Vos, Brunt, 2010, Moura et al., 2012). Uma vez que a senescência per si induz a processos inflamatórios (Pauli et al., 2010) e a permanência dessa inflamação subclínica, pode gerar transtornos na via de sinalização da insulina instalando um ambiente favorável para o aumento do estress oxidativo e consequentemente à lipotoxicidade. Estudos mostram que pessoas idosas (40-60 anos) apresentam maior incidência de DHGNA em relação a pessoas que apresentam idade menor que 20 anos (Brunt & Tiniakos, 2009). Devido às inúmeras alterações decorrentes da prática regular de exercício físico, esta prática vem sendo recomendada como uma potente ferramenta para o tratamento de diversas patologias e assim melhorando a qualidade de vida do indivíduo (Blohm, Ploch, Apelt 2012)

A redução na ingestão de gordura e a inclusão de exercício físico têm sido bastante recomendadas como tratamentos não farmacológicos (Pardee et al., 2009; Socha et al., 2009). Moura et al., (2012) mostraram que ratos submetidos à restrição calórica apresentam menor acúmulo de gordura no fígado e estudo realizado por Cintra et al., (2012) mostrou que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram quadro de esteatose hepática e que após submetidos ao treinamento físico esse quadro foi revertido. Se a prática regular de exercício

promove benefícios morfológicos, fisiológicos e funcionais, o efeito causado pela cessação desta prática ainda não foi bem elucidado. Nas últimas décadas, os efeitos da cessação de treinamento físico (destreinamento) tem sido foco de várias pesquisas, uma vez que, por motivos ainda não bem conhecidos, indivíduos que cessam o treinamento físico apresentam rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos (Marti & Howald, 1990; Kujala et al., 1994), quanto em animais (Craig et al., 1983; Applegate & Stern, 1987; Lambert et al., 1994), uma hipótese para tal fenômeno é o fato de que após a cessação do treinamento físico a sensibilidade à insulina no músculo decresce com o passar do tempo (Houmard et al., 1996; Arciero et al., 1998).

Portanto, é sabido que o cessamento da prática regular de exercício físico leva à alterações relacionadas ao metabolismo de carboidratos, em relação ao metabolismo de lipídeos, o destreinamento leva a maior atividade de enzimas envolvidas na síntese de ácido graxo e lipogênese (Simsolo et al., 1993; Lambert et al., 1994). Visto isso, conclui-se que o destreinamento físico leva à transtornos como acúmulo de gordura e resistência à insulina e como ainda não se avaliou o efeito do destreinamento a no acúmulo de gordura hepática, o presente estudo teve como objetivo avaliar o acúmulo de gordura hepática em ratos submetidos tanto ao treinamento físico bem como ao destreinamento .

Metodologia

Animais

Foram utilizados 30 ratos recém-desmamados da linhagem Wistar, com 21 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 (cinco ratos por gaiola), e mantidos à temperatura ambiente de 21° C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, alimentados com ração balanceada padrão Purina e água “*ad libitum*” até aos 90 dias de idade, e após os 90 dias de idade foram administradas dietas semi purificadas balanceada AIN-93M (Reeves, 1993).

Aspectos Éticos

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Os protocolos foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Biociências, da UNESP – Campus de Rio Claro (Protocolo: 4573/2010).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos a partir dos 21 dias de idade até ao sacrifício (150 dias de idade), Grupo Sedentário (GS): animais que permaneceram sedentários ao longo de todo o experimento (21-150 dias de idade); Grupo Treinado (GT): animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento ao longo de todo o experimento (28 aos 150 dias de idade) e Grupo Destreinado (GD): animais que foram submetidos ao protocolo de treinamento dos 28 aos 90 dias de idade e após isso, foram mantidos sedentários até ao final do experimento (150 dias de idade).

Adaptação ao meio líquido

Todos os animais foram adaptados ao meio líquido. A adaptação consistiu em manter o animal na água rasa a uma temperatura de $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com isso minimizar o estresse sofrido pelos animais perante o meio líquido.

Determinação da capacidade aeróbia

A capacidade aeróbia dos animais foi determinada pelo teste de lactato mínimo proposto por Tegtubur em 1993 e modificado para ratos adultos por Araújo et al., 2007 e para ratos recém-desmamados (28 dias de idade) por Mello et al., 2009. O teste consiste em, após indução a hiperlactacidemia, os animais depois de repousarem por um curto período de tempo voltam ao exercício físico de caráter incremental para, através do ciclo de cory, acelerar a remoção do lactato e transformá-lo em substrato e assim atingir um pico mínimo de lactato e quando a produção de lactato passa a ser maior que a remoção, as concentrações de lactato passam a se

e elevar, assumindo assim uma curva lactacidêmica em forma de “U”. A determinação da capacidade aeróbia foi realizada a cada 20 dias para que o efeito de ganho de massa do animal não interferisse na sobrecarga administrada.

Protocolo de treinamento/destreinamento

Os animais dos grupos GT e GD foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$, uma hora por dia, cinco dias por semana, suportando sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, equivalentes à 80% do LAn individual, identificado pelo teste de lactato mínimo realizado ao longo de todo o experimento. O grupo GT iniciou o protocolo de exercício físico aos 28 dias de idade e treinaram até ao final do experimento (16 semanas de treinamento) e o grupo GD iniciou aos 28 dias de idade e cessou o treinamento físico aos 90 dias de idade permanecendo sedentário até aos 150 dias de idade (8 semanas de treinamento físico + 8 semanas permanecendo sedentário).

Avaliações gerais

Todos os animais tiveram peso e comprimento corporal registrados semanalmente durante todo o experimento.

Teste de tolerância à glicose oral - TTGo

O TTGo foi realizado aos 150 dias de idade, 48 horas após a última sessão de exercício físico com os animais após 12 horas de jejum. Uma primeira coleta de sangue foi feita, através de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal. Em seguida, uma solução de glicose (80%) foi administrada para cada animal em uma quantidade de 2 g/Kg de peso através de sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25µL, visando à determinação das concentrações de glicose e insulina. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para coleta de todas as amostras sanguíneas. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método glicose-oxidase utilizando kits comerciais (Laborlab[®], Paulínea/SP, Brasil) e as de insulina, pelo método de radioimunoensaio (Herbert et al. 1965). Os resultados foram analisados

através do cálculo da área sob a curva de glicose e insulina durante o teste pelo método trapezoidal (Mathews et al., 1990), utilizando-se o software ORIGIN 6.0 (2000).

Teste de tolerância à insulina - TTI

A sensibilidade à insulina foi avaliada através do teste de tolerância à insulina (TTI). O teste foi realizado aos 150 dias de idade, 48 horas após a última sessão de exercício físico. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de um corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de insulina, na dose de 150 mU/100g de peso, foi administrada via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas após 4, 8, 12 e 16 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose, utilizando kits comerciais (Laborlab®, Paulínea/SP, Brasil). Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. Os resultados foram analisados pelo cálculo da taxa de remoção da glicose sérica (Kitt). O kitt foi calculado pela fórmula $(0,0693/t_{1/2}) \times 100$ e expresso em %/minuto. A remoção da glicose sanguínea ($t_{1/2}$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue nos momentos de decaimento após a administração de insulina (Lundbaek 1962) utilizando *software Origin 6.0*.

Sacrifício dos animais e obtenção de material biológico

Sangue

Ao final do experimento os animais foram exsanguinados, 48 horas depois da última avaliação "in vivo", após anestesia com CO₂ e em repouso de 72 horas, sendo o sangue coletado para a separação do soro e dosagem das transaminases hepáticas AST e ALT (marcadores de esteatose hepática), de triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, ácidos graxos livres e glicose usando kits comerciais e de insulina por radioimunoensaio (Hebert et al., 1965).

Tecido adiposo

A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica, epididimal e retroperitoneal foram removidos para pesagem total e determinação das concentrações de proteína (estimativa de hipertrofia), DNA (estimativa de hiperplasia) e relação proteína/DNA (estimativa de crescimento/número de células), as concentrações de triglicerídeos nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira et al., (1990).

Fígado

O fígado foi extirpado no momento do sacrifício para pesagem e uma alíquota (500 mg) foi utilizada para a determinação da concentração de triglicerídeos (Nogueira et al., 1990) e uma outra para determinação de glicogênio (Dubois et al., 1956).

Taxa lipogênica hepática

Em um lote separado de animais, aos 150 dias de idade, ratos de todos os grupos foram sacrificados 60 minutos após receberem administração intraperitoneal de água triciada ($3\text{mCi } 3\text{H}_2\text{O}$). Alíquotas do tecido adiposo da região mesentérica e hepático foram extraídas e pesadas para determinação da taxa lipogênica, utilizando-se água triciada, como previamente descrito por Robinson & Williamson (1978). A taxa de síntese de lipídios foi expressa em μmol de $3\text{H}_2\text{O}$ incorporada em lipídios por hora, por grama de tecido.

Resultados

O peso corporal dos animais foi registrado semanalmente e antes da eutanásia os testes de tolerância à glicose e o de resistência à insulina foram realizados. Foi visto que o treinamento físico reduziu o ganho de peso e que quando esta prática foi cessada houve maior ganho de peso para os animais pertencentes a este grupo quando comparado aos demais. Nenhuma diferença foi observada nos testes de tolerância à glicose bem como ao de resistência à insulina, mas quando analisada a área sob a curva de insulina que foi coletada durante o teste de tolerância à glicose, foi encontrado uma menor área sob a curva de insulina para os animais que foram submetidos ao exercício físico ao longo de todo o experimento (Tabela I).

Tabela I. Dados prévios ao sacrifícios

	<i>GS</i>	<i>GT</i>	<i>GD</i>
Ganho de Peso (28-90 dias (g))	286,91 ± 30,48 ^a	236,41 ± 32,58 ^b	236,41 ± 32,58 ^b
Ganho de Peso (90 - 160 dias) (g)	106,43 ± 38,26 ^a	99,71 ± 24,50 ^a	147,07 ± 36,19 ^b
Ganho de Peso (28-160 dias) (g)	429,06 ± 66,23 ^a	353,42 ± 51,01 ^b	426,64 ± 74,12 ^a
Índice de Lee	3,06 ± 0,09 ^a	2,97 ± 0,08 ^a	2,99 ± 0,09 ^a
TTG (mg/dLx120min)	21646,12 ± 1750,29 ^a	18523,92 ± 2342,49 ^a	20079,81 ± 2978,74 ^a
AUC insulina (ng/ml x 120min)	98,83 ± 37,08 ^a	28,34 ± 10,62 ^b	73,91 ± 24,82 ^a
TTI (% de remoção/min)	3,67 ± 0,61 ^a	6,36 ± 3,19 ^a	4,69 ± 1,20 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). GS: Grupo sedentário, GT: Grupo Treinado e GD: Grupo Destreinado. ANOVA one-way: *letras diferentes significam diferença estatística (a ≠ b ≠ c)*.

Ao final do período experimental, após serem primeiramente anestesiados e posteriormente eutanasiados, o soro foi separado para determinação da concentração de glicose, insulina, perfil lipídico circulante e das proteínas marcadoras de EHNA (AST e ALT). Analisando todos os parâmetros, não foi possível observar nenhuma diferença entre os grupos (Tabela II).

Tabela II. Dados séricos após o sacrifício

	<i>GS</i>	<i>GT</i>	<i>GD</i>
Glicose (mg/dL)	68,05 ± 17,48 ^a	64,99 ± 5,41 ^a	70,21 ± 12,30 ^a
Insulina pós-prandial (ng/ml)	1,88 ± 0,93 ^a	1,69 ± 0,78 ^a	1,81 ± 0,69 ^a
Insulina Jejum (ng/ml)	0,43 ± 0,22 ^a	0,41 ± 0,17 ^a	0,45 ± 0,20 ^a
HOMA	6,65 ± 2,59 ^a	6,16 ± 2,14 ^a	7,14 ± 2,45 ^a
AGL (µEq/L)	6,80 ± 2,35 ^a	4,83 ± 1,50 ^a	7,46 ± 2,39 ^a
Colesterol Total (mg/dL)	93,29 ± 19,69 ^a	98,35 ± 12,63 ^a	94,75 ± 12,01 ^a
HDL (mg/dL)	23,14 ± 4,14 ^a	23,17 ± 5,21 ^a	21,19 ± 7,61 ^a
LDL (mg/dL)	42,01 ± 17,84 ^a	38,95 ± 12,42 ^a	32,27 ± 14,81 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	150,22 ± 35,11 ^a	160,00 ± 18,47 ^a	173,65 ± 17,31 ^a
AST (U/L)	11,56 ± 3,61 ^a	12,42 ± 2,94 ^a	11,84 ± 3,51 ^a
ALT (U/L)	9,80 ± 3,91 ^a	7,45 ± 1,19 ^a	6,72 ± 2,01 ^a
AST/ALT	1,30 ± 0,52 ^a	1,71 ± 0,53 ^a	1,84 ± 0,55 ^a

Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). GS: Grupo sedentário, GT: Grupo Treinado e GD: Grupo Destreinado. ANOVA one-way: letras diferentes significam diferença estatística.

Os tecidos adiposos de diferentes regiões (mesentérica, epididimal, retroperitoneal e subcutânea) foram removidos para pesagem e posterior análise da concentração de triglicerídeos, proteína e DNA. Em um lote separado de animais, a análise da atividade lipogênica foi realizada somente para a gordura mesentérica. O treinamento físico além de ter reduzido os estoques de todas as gorduras analisadas, reduziu também a quantidade de triglicerídeos das gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal. O destreinamento físico, fez com que essa redução de gordura e triglicerídeos fosse neutralizada e aumentando ainda a atividade lipogênica da gordura mesentérica (Tabela III).

Tabela III. Dados referentes aos tecidos adiposos de diferentes regiões.
Tecidos Adiposos

<i>Mesentérico</i>	<i>GS</i>	<i>GT</i>	<i>GD</i>
Peso (g)	4,53 $\pm$ 1,60 ^a	3,40 $\pm$ 1,20 ^b	5,27 $\pm$ 1,94 ^a
Triglicerídeos (mg x peso total)	41,72 $\pm$ 3,09 ^a	21,82 $\pm$ 2,09 ^b	40,73 $\pm$ 2,27 ^a
Proteína	4,40 $\pm$ 2,62 ^a	5,22 $\pm$ 1,01 ^a	3,68 $\pm$ 1,53 ^a
DNA	0,03 $\pm$ 0,01 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^a
Proteína/DNA	142,11 $\pm$ 27,95 ^a	158,45 $\pm$ 30,89 ^a	139,93 $\pm$ 42,86 ^a
Lipogênese (μmol ³H₂O Incorporado/h x g)	2,90 $\pm$ 0,58 ^a	2,92 $\pm$ 1,38 ^a	5,07 $\pm$ 3,87 ^b

<i>Epididimal</i>	<i>GS</i>	<i>GT</i>	<i>GD</i>
Peso	4,65 $\pm$ 1,29 ^a	2,82 $\pm$ 1,10 ^b	4,43 $\pm$ 1,60 ^a
Triglicerídeos	47,19 $\pm$ 3,79 ^a	26,36 $\pm$ 2,76 ^b	41,90 $\pm$ 2,53 ^a
Proteína	3,98 $\pm$ 1,62 ^a	3,73 $\pm$ 0,89 ^a	3,86 $\pm$ 1,02 ^a
DNA	0,02 $\pm$ 0,010 ^a	0,02 $\pm$ 0,004 ^a	0,02 $\pm$ 0,004 ^a
Proteína/DNA	217,77 $\pm$ 46,39 ^a	210,14 $\pm$ 26,66 ^a	214,22 $\pm$ 53,97 ^a

<i>Retroperitoneal</i>	<i>GS</i>	<i>GT</i>	<i>GD</i>
Peso	6,41 $\pm$ 3,60 ^a	3,22 $\pm$ 1,12 ^a	4,87 $\pm$ 1,59 ^a

Triglicerídeos	101,47 ± 4,22 ^a	46,85 ± 3,46 ^b	76,70 ± 4,73 ^c
Proteína	4,59 ± 1,42 ^a	5,25 ± 1,19 ^a	3,96 ± 0,78 ^a
DNA	0,04 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
Proteína/DNA	144,83 ± 60,48 ^a	178,66 ± 48,58 ^a	157,26 ± 49,17 ^a

<i>Subcutâneo</i>	GS	GT	GD
Peso	2,82 ± 1,20 ^a	1,85 ± 0,62 ^b	2,50 ± 0,76 ^a
Triglicerídeos	76,56 ± 9,39 ^a	57,46 ± 7,65 ^a	59,60 ± 3,42 ^a
Proteína	7,23 ± 1,59 ^a	8,54 ± 2,24 ^a	6,88 ± 2,80 ^a
DNA	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,02 ^a
Proteína/DNA	150,27 ± 18,58 ^a	164,14 ± 21,12 ^a	146,89 ± 22,03 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). GS: Grupo sedentário, GT: Grupo Treinado e GD: Grupo Destreinado. ANOVA one-way: letras diferentes significam diferença estatística ($a \neq b \neq c$).

No tecido hepático, nem o treinamento físico nem o destreinamento interferiram na concentração de glicogênio, triglicerídeos como também na síntese de lipídeos neste órgão (Tabela IV).

Tabela IV. Análises hepáticas ao final do experimento

	GS	GT	GD
Glicogênio (mg%)	7,24 ± 2,62 ^a	6,73 ± 1,41 ^a	7,29 ± 2,27 ^a
Lipogênese (μmol ³H₂O Incorporado/h x g)	24,41 ± 1,81 ^a	24,15 ± 4,95 ^a	20,98 ± 2,04 ^a
Triglicerídeos (m%)	11,61 ± 3,85 ^a	8,89 ± 3,94 ^a	11,32 ± 4,34 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). GS: Grupo sedentário, GT: Grupo Treinado e GD: Grupo Destreinado. ANOVA one-way: letras diferentes significam diferença estatística ($a \neq b \neq c$).

Discussão

O sedentarismo tem crescido de forma alarmante em todo o mundo e consigo trazendo várias patologias em decorrência do baixo gasto calórico e aumento na ingestão de alimentos,

visto que a prática regular de exercício físico tem sido bastante utilizada como uma ferramenta não farmacológica no combate dessas doenças decorrentes do sedentarismo, o presente estudo objetivou analisar os efeitos decorrentes do exercício físico e após sua cessação em vários parâmetros metabólicos.

Ao longo de todo o experimento os animais tiveram seus pesos registrados semanalmente, na primeira fase de experimento, foi possível observar que os animais submetidos ao exercício físico regularmente dos 28 aos 90 dias de idade apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais que permaneceram sedentários. Na segunda etapa (90 aos 160 dias de idade), os animais pertencentes ao grupo que cessou o treinamento apresentou maior ganho de peso em relação ao sedentário bem como ao treinado. Analisando a cinética do peso corporal ao longo de todo o experimento, foi possível analisar que animais treinados que têm seu exercício físico cessado apresentam mesmo peso corporal que animais sedentários. O grande achado deste estudo foi observar a variação de peso entre 90 e 160 dias de idade, onde animais submetidos à cessação do exercício físico apresentaram maior ganho de peso em relação aos outros grupos.

De acordo com a literatura, indivíduos que cessam o treinamento físico apresentam rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina tanto em humanos (Marti & Howald, 1990; Kujala et al., 1994), quanto em animais (Craig et al., 1983; Applegate & Stern, 1987; Lambert et al., 1994), uma vez que a prática regular de exercício físico modula adaptações fisiológicas tais como: aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (Marinho et al., 2012; Mann et al., 2010), alguns autores acreditam que o maior ganho de peso decorrente da cessação do exercício físico se dar-se-á perda da capacidade de metabolizar a glicose (redução da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose).

Mesmo os animais submetidos ao destreinamento terem apresentado maior peso corporal e consequentemente maiores estoques de gordura, ao final do experimento, estes animais não apresentaram diferença em relação a tolerância à glicose nem em relação a resistência à insulina. Uma vez que citocinas e o estresse oxidativo podem interferir no metabolismo da glicose, um fato que pode explicar o motivo pelo qual no presente estudo o exercício e o destreinamento não alteraram o metabolismo da glicose pode ser entendido por um estudo

realizado por Agarwal e colaboradores (Agarwal et al., 2012). Os autores mostraram que animais treinados em esteira que nem o treinamento físico nem o destreinamento alteraram níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) e nem o balanço redox (iNOS e Cu/ZnSOD). Indo de encontro com os achados no presente estudo, Lehnert e colaboradores (Lehnert et al., 2010) após submeterem animais controles a um protocolo de treinamento em esteira 1h/dia, 5dias/semana por 10 semanas e depois submetê-los a uma ou duas semanas de destreinamento não observaram diferenças entre os grupos.

Mesmo a área sob a curva de glicose durante o TTG não ter sido diferente para os grupos analisados, quando analisada a área sob a curva de insulina decorrente do mesmo teste foi possível observar que os animais do grupo treinado apresentaram menor valor, significando que estes animais treinados secretaram concentrações menores de insulina e ainda assim captaram a mesma quantidade de glicose que os demais grupos. De acordo com Gustat et al., 2002, há forte relação entre inatividade física e resistência à insulina e de acordo com Heath et al. (1983), Houmard et al. (1993) e Arciero et al. (1998) a sensibilidade à insulina reduz com o passar do tempo. Estes mesmos autores mostram que a área sob a curva de insulina, durante o teste de tolerância à glicose, aumenta conforme o indivíduo aumenta os dias sem exercício físico (Heath et al. 1983; Houmard et al. 1993; Arciero et al. 1998) corroborando assim com os achados no presente estudo.

Tanto o treinamento físico bem como o destreinamento físico não alteraram os perfis séricos de glicose, insulina (pós-prandial e de jejum), índice Homa, ácidos graxos livres, colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicerídeos, AST, ALT e sua relação AST/ALT no presente estudo. Alguns estudos mostram que o exercício físico modula o metabolismo da glicose (Laaksonen et al. 2005, Iijima et al 2012) outros mostram que o destreinamento, por aumentar a quantidade de tecido adiposo leva à resistência à insulina que é caracterizado pelo quadro hiperinsulinemia (Marti & Howald, 1990; Kujala et al., 1994). No presente estudo os animais que foram submetidos ao treinamento e os que foram submetidos ao treinamento e depois ao destreinamento apresentaram glicemia, insulinemia (estado de jejum e alimentado), índice HOMA semelhantes ao controle, o mesmo foi encontrado por Ribeiro et al

(2012) onde após submeter ratos a diferentes protocolos de treinamento (contínuo e intermitente) não observou nenhuma alteração na glicemia e nos dois estados de insulinemia. O fato de os animais treinados não apresentarem diferença com o grupo controle é um resultado esperado, uma vez que o exercício físico modula vias para levar o organismo à homeostase e como estes animais são tidos como eutróficos a não diferença entre o treinamento e o controle era esperada.

Fato inesperado encontrado no presente trabalho foi de o destreinamento por elevar o estoque de tecido adiposo não alterou o perfil lipídico sérico analisado uma vez que todo o organismo foi alterado em decorrência de ter o treinamento cessado, como ganho de peso e consequentemente maior tecido adiposo.

Em relação aos níveis de AST e ALT, dentro da denominação geral, designa-se esteatose hepática (EH) a DHGNA sem sinais de hepatite e de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), à DHGNA com hepatite. A EH pode levar à EHNA, que através de necro-inflamações pode evoluir para fibrose, cirrose e falência hepática (Mulhall et al, 2002). Os níveis de AST e ALT são alterados quando o tecido hepático apresenta aumento do tecido conjuntivo e com isso faz com que essas proteínas se extravasem para o meio extracelular. Visto que os animais do presente estudo não apresentaram acúmulo de gordura hepática e assim não foram induzidos ao quadro de inflamação neste órgão, assim é de se esperar que não ocorram alterações nas concentrações dessas proteínas.

Visto que o excesso de tecido adiposo é considerado um fator de risco, formas para reduzir o ganho ou seu volume são de suma importância (Kim et al., 2008). De acordo com Trussardi et al (2013) a redução de 5% do peso corporal, por reduzir os estoques de gordura aumenta a responsividade da insulina ao organismo. É sabido que a restrição calórica é a ação mais sensível para a perda de peso (Hall 2007), mas a prática regular de exercício físico além de ajudar no déficit calórico diário, por aumentar a taxa metabólica basal, ajuda na manutenção do peso. Neste estudo, os tecidos adiposos de diferentes regiões foram pesados e posteriormente tiveram suas concentrações de triglicerídeos determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira et al., (1990) e a excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo

com a descrição de Cinti (2005). Foi observado que o treinamento reduziu os estoques de gordura analisados sob a forma de peso e quantidade de triglicerídeos e que os animais pertencentes ao grupo destreinado não apresentaram esta redução, mostrando assim que a cessação do treinamento físico promoveu adaptações onde houve a perda dos benefícios decorrentes do exercício físico. Sabe-se que o tecido muscular é mais permeável à gordura então, a redução do tecido adiposo além de poder ser explicada pelo aumento da taxa metabólica basal, pode ser também explicado devido ao fato de que a maior utilização de gordura como substrato energético ocorre próximo a 60-65% VO₂max (Achten, Gleeson, Jeukendrup, 2002; Achten, Jeukendrup, 2003), pois nesta intensidade a ação da lipase hormônio sensível é maior, assim fazendo com que ocorra maior lipólise e consequentemente maior disponibilidade deste substrato ao tecido muscular. Especificamente no tecido adiposo da região mesentérica a atividade lipogênica foi avaliada e foi possível perceber que o destreinamento físico fez com essa atividade se apresentasse acima dos níveis encontrados tanto para o grupo treinado e para o grupo controle.

Nenhuma diferença foi observada nos parâmetros hepáticos: estoques de glicogênio, gordura sob forma de triglicerídeos e atividade lipogênica. Uma vez que o glicogênio contribui de maneira significativa para a manutenção do exercício físico é de suma importância o conhecimento de métodos para que se tenha um maior estoque desse substrato (Putman et al., 1998). Durante a prática de exercício físico o fígado atua por meio da glicogenólise e também por meio dos processos de neoglicogênese, em fases mais avançadas, assim, no músculo, após a interrupção deste prática proteínas envolvidas na síntese de glicogênio ficam mais ativas e, tendo um aporte adequado de carboidrato ocorre uma supercompensação de reserva deste substrato (Franch, Aslesen & Jensen, 1999), em relação ao tecido hepático e a teoria da supercompensação de glicogênio ainda não está bem descrito na literatura, pois no presente estudo o treinamento físico não alterou os estoques de glicogênio hepático de animais eutróficos assim como foi encontrado por outros vários autores usando diferentes modelos de treinamento (De Souza et al, 2010; Ribeiro et al, 2012; Donatto et al, 2012). Em relação ao acúmulo de

gordura hepático não ter sido alterado é um resultado esperado, uma vez que em nenhum dos grupos analisados houve aumento de reserva desse substrato.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que o treinamento físico realizado desde a infância pode minimizar a incidência de obesidade e sua cessão pode fazer com que algumas respostas benéficas vindas das práticas do exercício físico sejam perdidas.

Referências

Achten J, Gleeson M, Jeukendrup A. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc*, 34:92-97, 2002.

Alexandre M Lehen¹, Natalia M Leguisamo¹, Graziela H Pinto^{1,2}, Melissa M Markoski¹, Kátia De Angelis³, Ubiratan F Machado⁴, and Beatriz Schaan. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: a phenomenon unrelated to GLUT4 expression. *Cardiovasc Diabetol*. 2010; 9: 67. Published online 2010 October 28. doi: 10.1186/1475-2840-9-67

Arciero, P. J., Smith, D. L. & Calles-Escandon, J. (1998). Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. *J Appl Physiol* 84, 1365-1373.

Brunt EM, Tiniakos DG. 2009. Alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. In *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*, ed. RD Odze, JR Goldblum, pp. 1007–14. Philadelphia: Elsevier

De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Velloso LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol*. 2010 Jun 15;588(Pt 12):2239-53. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183996.

Deepmala Agarwal¹, Rahul B. Dange¹, Jorge Vila², Arturo J. Otamendi³, and Joseph Francis^{1,*}. Detraining Differentially Preserved Beneficial Effects of Exercise on Hypertension: Effects on Blood Pressure, Cardiac Function, Brain Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52569. Published online 2012 December 20. doi: 10.1371/journal.pone.0052569

Donatto FF, Neves RX, Rosa FO, Camargo RG, Ribeiro H, Matos-Neto EM, Seelaender M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine*. 2012 Nov 21. doi:pii: S1043-4666(12)00756-9. 10.1016/j.cyto.2012.10.021.

Franch J, Aslesen R & Jensen J (1999) Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Biochem J* 344 Pt 1, 231–235.

Gustat J, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: the Bogalusa Heart Study. *J Clin Epidemiol.* 2002;55:997–1006. 10.1016/S0895-4356(02)00427-4.

Kim K, Valentine RJ, Shin Y, et al. (2008) Associations of visceral adiposity and exercise participation with C-reactive protein, insulin resistance, and endothelial dysfunction in Korean healthy adults. *Metabol Clin Exp* 57, 1181–1189.

Hall KD. What is the required energy deficit per unit weight loss? *Int J Obes*, 32 (3) (2007), pp. 573–576.

Kriska AM, LaPorte RE, Pettitt DJ, Charles MA, Nelson RG, Kuller LH, Bennett PH, Knowler WC. The association of physical activity with obesity, fat distribution and glucose intolerance in Pima Indians. *Diabetologia.* 1993;36:863–869. 10.1007/BF00400363. [PubMed]

Iijima K, Imuro S, Shinozaki T, et al. Lower physical activity is a strong predictor of cardiovascular events in elderly patients with type 2 diabetes mellitus beyond traditional risk factors: the Japanese Elderly Diabetes Intervention Trial. *Geriatr Gerontol Int.* 2012 Apr;12 Suppl 1:77-87. doi: 10.1111/j.1447-0594.2011.00815.x.

Marti, B. & Howald, H. (1990). Long-term effects of physical training on aerobic capacity: controlled study of former elite athletes. *J Appl Physiol* 69, 1451-1459.

Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Jr, Karter AJ, Haffner SM, Rewers MJ, Saad M, Bergman RN. Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA.* 1998;279:669–674. 10.1001/jama.279.9.669.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, da Silva AS, Moraes JC, Prada PO, de Almeida Leme JA, Luciano E, Velloso LA, Carnevali JB, Saad MJ. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev.* 2010 May;131(5):323-9. doi: 10.1016/j.mad.2010.03.004.

Putman CT, Jones NL, Hultman et al (1998) Effects of short-term submaximal training in humans on muscle metabolism in exercise. *Am J Physiol* 275, E132–E139.

Ribeiro et al. Muscle protein metabolism in neonatal alloxanadministered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012, 4:5

Ribeiro LF, Teixeira IP, Aparecido da Silva G, et al. Effects of swimming training on tissue glycogen content in experimental thyrotoxic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2012, 90(5): 587-593, 10.1139/y2012-044.

Stefan N, Kantartzis K, Häring H. Review Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocr Rev.* 2008 Dec; 29(7):939-60

Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Review Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5():145-71.

Trussardi Fayh AP, Lopes AL, Fernandes PR, Reischak-Oliveira A, Friedman R. Impact of weight loss with or without exercise on abdominal fat and insulin resistance in obese individuals: a randomised clinical trial. *Br J Nutr.* 2013 Jan 10:1-7.

Achten J, Jeukendrup AE. Maximal fat oxidation during exercise in trained men. In *J Sports Med*, 24:603-608, 2003.

Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. v.19 p.221-229, 1999

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, v.55 p.434-8, 1980.

Pardee PE, Lavine JE, Schwimmer JB. Diagnosis and treatment of pediatric nonalcoholic steatohepatitis and the implications for bariatric surgery. *Semin Pediatr Surg*, v.18 p.144-151, 2009.

Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v.48 p.587-596, 2009.

Mann CJ, Ayuso E, Anguela XM, Bosch F. Skeletal muscle metabolism in the pathology and treatment of type 1 diabetes. *Curr Pharm Des* 2010;16:1002-1020.

D. Blohm^{1,2}, T. Ploch², S. Apelt². Efficacy of exercise therapy to reduce cardiometabolic risk factors in overweight and obese children and adolescents: a systematic review. *Dtsch med Wochenschr* 2012; 137(50): 2631-2636

Kujala, U. M., Kaprio, J., Taimela, S. & Sarna, S. (1994). Prevalence of diabetes, hypertension, and ischemic heart disease in former elite athletes. *Metabolism* 43, 1255-1260.

Craig, B. W., Thompson, K. & Holloszy, J. O. (1983). Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. *J Appl Physiol* 54, 571-575.

Applegate, E. A. & Stern, J. S. (1987). Exercise termination effects on food intake, plasma insulin, and adipose lipoprotein lipase activity in the Osborne-Mendel rat. *Metabolism* 36, 709-714.

Lambert, E. V., Wooding, G., Lambert, M. I., Koeslag, J. H. & Noakes, T. D. (1994). Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. *J Appl Physiol* 77, 2564-2571.

Houmard, J. A., Hortobagyi, T., Neufer, P. D., Johns, R. A., Fraser, D. D., Israel, R. G. & Dohm, G. L. (1993). Training cessation does not alter GLUT-4 protein levels in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 74, 776-781.

Simsolo, R. B., Ong, J. M. & Kern, P. A. (1993). The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. *J Clin Invest* 92, 2124-2130.

Tegtbur, U.; M. W. Busse and K. M. Braumann. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: (5): 620-627, 1993.

Mello, MAR ; Moura, LP ; Ribeiro, C, et al. Determination of anaerobic threshold in weanling rats by lactate minimum test.. In: 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2010, Antalya. Book of Abstracts 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2010. v. 15. p. 171-172.

ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, in press.

HERBERT, V. et al. Coated Charcoals immunoassay of insulin. *J. Clin Endocrinol Metab.*, v.25, p.1375-84, 1965.

ROBINSON, A. M. & WILLIAMSON, D. H. Control of glucose metabolism in isolated acini of the lactating mammary gland of the rat: effects of oleat on glucose utilization and lipogenesis. *Biochemistry Journal.* 170, 609-613, 1978.

Mathews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 1990, 27:230-235.

Lundbaek K: Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962, 3:1057-1513.

Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP: Sangue-parte I: Glicídios. In *Métodos de bioquímica clínica*. Edited by: Nogueira DM. et al. São Paulo: Pancast; 1990:153-168..

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005 Nov;46(11):2347-55. Epub 2005 Sep 8.

Dubois, B., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Calométic method for determination of sugar and relate sustances. *Anal Chem*, 28: 350-356, 1956.

Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol.* 2012 Jul;227(7):2917-26. doi: 10.1002/jcp.23037.

Laaksonen M, Sarlio-Lähteenkorva S, Leino-Arjas P, Martikainen P, Lahelma E. Body weight and health status: importance of socioeconomic position and working conditions. *Obes Res.* 2005 Dec;13(12):2169-77.

Mulhal, P.B.; Ong, .J.P.; Younossi, Z.M. (2002). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17,1136-43.

MOURA, LP et al. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. *Rev. Nutr.* [online]. 2012, vol.25, n.6 pp. 685-693 .

Moura et al. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fatLipids in Health and Disease 2012, 11:2

Cintra DE, Ropelle ER, Vitto MF, Luciano TF, Souza DR, Engelmann J, Marques SO, Lira FS, de Pinho RA, Pauli JR, De Souza CT. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Life Sci.* 2012 Oct 5;91(11-12):395-401. doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.002. Epub 2012 Aug 11.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Gc JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76Arodent diet. *J Nutr.* v.123 p.1939-51, 1993.

4.5 Artigo 5: O presente projeto de pesquisa, ofertando ração de modo *ad libitum* ao longo de todo o experimento, não apresentou diferença significativa em relação ao peso corporal dos animais controles (Alimentados com dieta controle e hiperlipídica). Assim sendo, surgiu a hipótese de que o modo como a ração foi ofertada aos animais poderia estar induzindo animais controles à obesidade em decorrência do ambiente “obesogênico” imposto a eles (baixa atividade física associado a um alto consumo alimentar). Por isso, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da restrição alimentar no acúmulo de gordura hepática em ratos.

Publicado – Moura LP, et al. FOOD RESTRICTION AND THE ACCUMULATION OF FAT IN THE LIVERS OF WISTAR RATS. *The Open Nutrition Journal*, v. 6, p. 26-31, 2012.

Food Restriction and the Accumulation of Fat in the Livers of Wistar Rats

Leandro P. de Moura^{*,#1}, Marcelo Costa Júnior^{#,1}, Rodrigo A. Dalia^{#,1}, Michel B. de Araújo^{#,1}, Ismael F. Freitas Júnior^{#,2} and Maria A. R. de Mello^{#,1}

¹Laboratory of Nutrition, Metabolism and Exercise, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 24^a avenue n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brazil

²Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Roberto Simonsen Street, 305, Presidente Prudente, SP, Brazil

Abstract: Laboratory rats, when kept in conditions regarded as "standard", are physically inactive, do not have proper environmental stimulation and have free access to food, which can lead to metabolic syndrome and fat accumulation in the liver. This study aimed to analyse the susceptibility of "control animals", which have free access to food, to metabolic syndrome and fat accumulation in the liver compared to animals that were subjected to food restriction. Ninety-day-old Wistar rats were divided into two groups, fed ad libitum (free access to food) and food restricted (60% of the amount of food consumed by the ad libitum group), according to a protocol of alimentation for four weeks. To analyse the effects of food restriction on the nutritional status, serum albumin and total protein levels were analysed and showed no differences between groups, which indicated an absence of malnutrition. The retroperitoneal, subcutaneous and mesenteric fat tissues were weighed, and it was found that the mesenteric fat tissue showed a greater reduction from the food restriction. There was no difference in the insulin sensitivity and the fat accumulation in the liver between groups. However, it was shown that for every 1% decrease in weight due to the food restriction, insulin sensitivity increased by 0.67% and hepatic fat decreased. Therefore, we can conclude that caloric restriction leads to weight loss. Although no significant differences in insulin sensitivity and hepatic fat content existed between the groups at the end of the experiment, weight loss modulated these variables.

Keywords: Food restriction, Nonalcoholic fatty liver disease, Rats.

INTRODUCTION

The accumulation of fat in the liver is a disease characterised by the presence of fat droplets in the organ [1] and discovered by Ludwig *et al.*, in 1980 [2]. This accumulation can vary from a simple steatosis without evidence of inflammation to necro-inflammatory manifestations, including nonalcoholic hepatitis that may progress to fibrosis in 50% of cases, to cirrhosis in 15% of cases and to liver failure in 3% of cases [3-7]. This framework is found in 57.5 to 75% of obesity cases [5] due to changes such as increased consumption of fat and decreased secretion of lipids by the liver [8] or by other mechanisms such as oxidative stress, an inflammatory response and insulin resistance (IR) [9, 10].

Increased caloric intake is directly related to the development of insulin resistance [11]. This imbalance in energy consumption leads to obesity, and in 1988, Reaven [12] was among the first to associate the hypertrophy of adipose tissue, commonly found in obese patients, with IR. One of the ways obesity causes IR is through the action of the fraction of the saturated fatty acids that impairs the transduction of the insulin signalling pathway causing protein kinases to be

serine-phosphorylated [13]. For an improved quality of life, the main changes include regular participation in physical activity and calorie restriction [14-16].

Because there are limitations on research using humans, animal models have become very important study tools in several areas of science. Mice and rats are widely used as animal models in biomedical research, including the field of nutrition, which uses about 90% of all research animals. When housed in conditions regarded as "standard" in most laboratories, these rodents are sedentary, have continuous access to food and do not have adequate environmental stimulation [17]. Therefore, it is questionable whether these animals are adequate "controls" for studies involving altered nutritional states.

Compared with animals that exercise and are properly stimulated, these animals used as a "control" are relatively overweight, insulin-resistant and hypertensive [18, 19]. In fact, a simple reduction of daily food intake to 20- 40% below that of ad libitum consumption or by feeding intermittently rather than continuously was effective in significantly reducing the risk of chronic degenerative diseases such as cancer, type 2 diabetes and kidney disease and prolonged the life span of laboratory rats and mice by 40% without causing malnutrition [20-24].

Food restriction is an important tool to minimise the incidence of obesity and its consequences [25, 26], and there are few studies in the literature analysing the liver responses of Wistar rats subjected to caloric restriction; therefore, this

*Address correspondence to this author at the Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24^a n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Rio Claro, Zip code: 13506-900, SP, Brazil; Tel: +55(19)8197-9999; Fax: +55(19)3534-0009; E-mail: mellomar@rc.unesp.br

[#]These authors contributed equally to this work.

study aimed to analyse the susceptibility of control animals to obesity, IR and hepatic fat accumulation compared to animals that were subjected to dietary restriction.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Treatment

The study used 20 Wistar rats (90 days old), which came from the Central Vivarium (Biotério Central) of UNESPat the Botucatu Campus, that were maintained in the vivarium of the biodynamic laboratory of the Department of Physical Education, Biosciences Institute of UNESP, Rio Claro Campus. The animals were housed in polyethylene cages (five animals per cage) and kept at a controlled room temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 12 hours of light/12 hours of dark with water provided *ad libitum*. The experiment was conducted in accordance with the current Brazilian legislation and standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA). All standards were adhered to rigorously. The use of animals in this study was approved by the ethics committee at the Biosciences Institute at UNESP, Rio Claro (Process: 2011/6274).

Experimental Groups and Design

The animals were separated into two groups (10/group), *ad libitum* (AL) and food restriction (FR), according to a four-week feeding protocol.

The *ad libitum* group of animals had free access to food, and the food intake was recorded daily. The food restriction group was offered food in a quantity corresponding to 60% of the average amount consumed by the *ad libitum* group during the previous day. This protocol was designed to cause dietary restriction without malnutrition [21]. All animals in both groups had free access to water.

Insulin Tolerance Test - ITT

There were previous studies from our research group in which insulin sensitivity was evaluated by the insulin tolerance test (ITT), pointing interesting results [27,28]. Therefore, in this study insulin sensitivity was evaluated through an ITT. This test was performed at the end of the experiment. An initial blood sample was obtained by making a cut at the end of the animals' tails (time 0). An insulin solution, at a dose of 150 mU/100 g body weight, was then administered through an intraperitoneal injection. New blood samples were obtained after 4, 8, 12, 16, and 20 minutes using heparinised capillaries calibrated to 25 μL for determining the glucose concentrations by using commercial kits (Laborlab®). A single cut at the end of the tail was sufficient for all sample collections. The results were analysed by calculating the glucose removal rate (KITT). KITT was expressed as %/minute and was calculated using the formula $(0.0693/t_{1/2}) \times 100$. Glucose removal ($t_{1/2}$) was calculated by a least squares analysis of the curve of the blood glucose levels during the period of insulin decay following its administration [29] by using the Origin 6.0 software.

Evaluation of the Nutritional State

During the experimental period, the body weight of both groups and the food intake of the *ad libitum* group were

recorded daily. At the end of the experiment, all animals were killed by decapitation after anaesthesia with CO_2 . Blood samples were collected for the measurement of total protein and albumin levels and the liver was used for the measurement of triglycerides [30] for the biochemical evaluation of the nutritional status.

Statistics

The results were expressed as means $\pm$ standard deviations and statistically analysed using the Student's t-test with a significance level pre-established at 5%.

RESULTS

The animals we subjected to food restriction had a 19.5% weight loss (Fig. 1), while those fed *ad libitum* showed a weight gain.

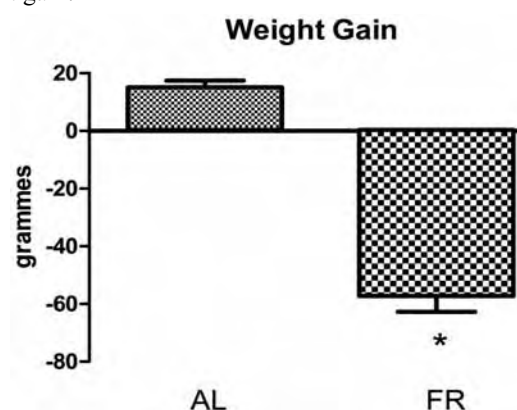


Fig. (1). Analysis of weight gain performed by calculating the delta values. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (10 animals/group). * $\neq$ control group.

To evaluate the nutritional status of the animals, the serum concentrations of total protein and albumin were analysed, and it was shown that the caloric restriction protocol used in this study did not cause malnutrition in these animals because they did not differ between groups (Fig. 2).

In relation to insulin sensitivity, there was no difference between the means of the food restricted group when compared to the control group (Fig. 3), but when the loss of weight in relation to insulin sensitivity was analysed, it was found that every 1% decrease in weight improved insulin sensitivity by 0.67%.

When the weight of adipose tissue from different regions was analysed, it was found that mesenteric fat was the most sensitive depot to the caloric restriction (Fig. 4A); for each 1% loss in weight, there was a 2.94% reduction in the mesenteric fat weight. Subcutaneous fat was also reduced in the group subjected to caloric restriction (Fig. 4B). Each 1% loss in weight caused a 1.49% decrease in fat. There was also a reduction of retroperitoneal fat (Fig. 4C). For each 1% loss in total body weight, 2.8% of retroperitoneal fat was reduced.

The hepatic fat concentration was not different between the groups (Fig. 5), but for each 1% loss of body weight, body fat in the stock declined 0.67%.

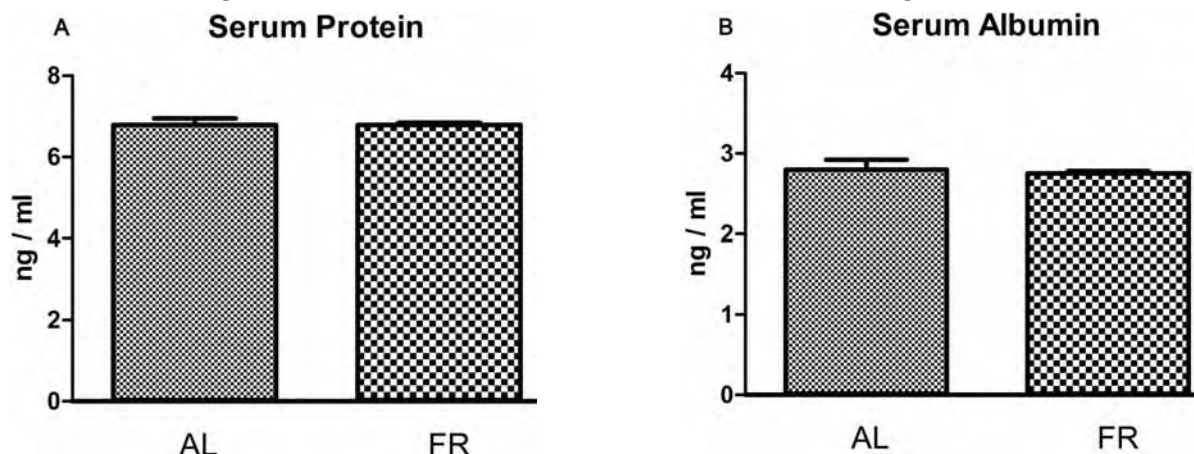


Fig. (2). The serum concentrations of the total protein (A) and albumin (B) at the end of the experiment. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (10 animals/group).

DISCUSSION

Laboratory rodents are widely used in scientific research and housed in conditions that are considered "standard" in most laboratories, even though these animals are sedentary, have continuous access to food and do not have adequate environmental stimulation [17]. This contributes to the development of hypertension, obesity and IR [18, 19], which directly interferes in research related to nutrition. Therefore, according to the literature [25, 26], dietary restriction is necessary to minimise the metabolic changes caused by obesity and IR, but little is known about its effects on the livers of eutrophic rats. In our study, it became clear that dietary restriction (40%), in addition to reducing the weight gain of animals without causing malnutrition, also contributed to greater insulin sensitivity and less fat accumulation in the liver.

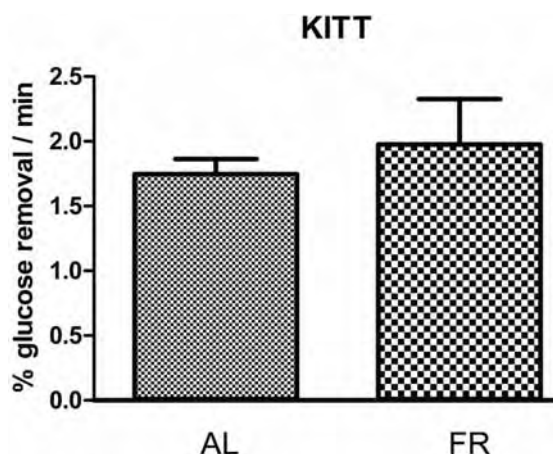


Fig. (3). The removal rate calculated by KITT serum glucose during the insulin tolerance test at the end of the experiment. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (10 animals/group).

To evaluate the nutritional status of the animals, serum albumin and total protein levels were analysed [31-33]. According to the results, the animals subjected to food restriction in the present study showed no evidence of malnutrition because the concentrations of total protein and serum albumin did not decrease.

According to Kraemer *et al.* [34], the main purpose of food restriction is to minimise the development of obesity. From our results, we note that a 40% food restriction promoted a 19.5% decrease of body weight when compared to the ad libitum control animals. According to the literature [33-35], high-energy intake contributes directly to an increased storage of triglycerides in the adipose tissue along with an increase of its final volume. Data related to the total increase in the adipose tissue from calorie availability [35-37] were more evident when the weights of adipose tissue from different regions were analysed. Food restriction reduced the weights of the mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous adipose tissues by 57.35%, 54.63% and 29.16%, respectively.

The mesenteric fat in our study was the of the most sensitive to the food restriction. Hermsdorff & Miller [38] showed that the greater susceptibility to a loss of fat tissue located in the visceral region was due to its high vascularity, and the size of their adipocytes indicated a greater response to catecholamines.

The animals with an ad libitum food supply had a higher amount of adipose tissue, specifically the fat tissue in the visceral region, and this increase can be related directly to IR. Various recent research shows that fat tissue has other functions in addition to storing fat [39,40]. White adipose tissue is considered an endocrine organ, producing active hormones such as tumour necrosis factor (TNF- α), resistin, adiponectin and leptin [41]. TNF- α is directly linked to insulin resistance and leads to a reduced insulin-stimulated auto-phosphorylation of the insulin receptor and a subsequent inhibition of the phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). In addition, TNF- α induces changes in the serine phosphorylation of IRS-1, which causes this molecule to inhibit the signalling of the insulin receptor [40]. In our study, we found that in the IR framework, there was a 0.67% improvement in peripheral insulin sensitivity for every 1% in weight loss. Our findings corroborate a study by Björntorp [41] that showed that decreases in total mesenteric fat due to dietary restriction can modulate the responses of peripheral tissues to insulin.

The response of peripheral tissues to insulin will interfere directly in the accumulation of fat in the liver because this

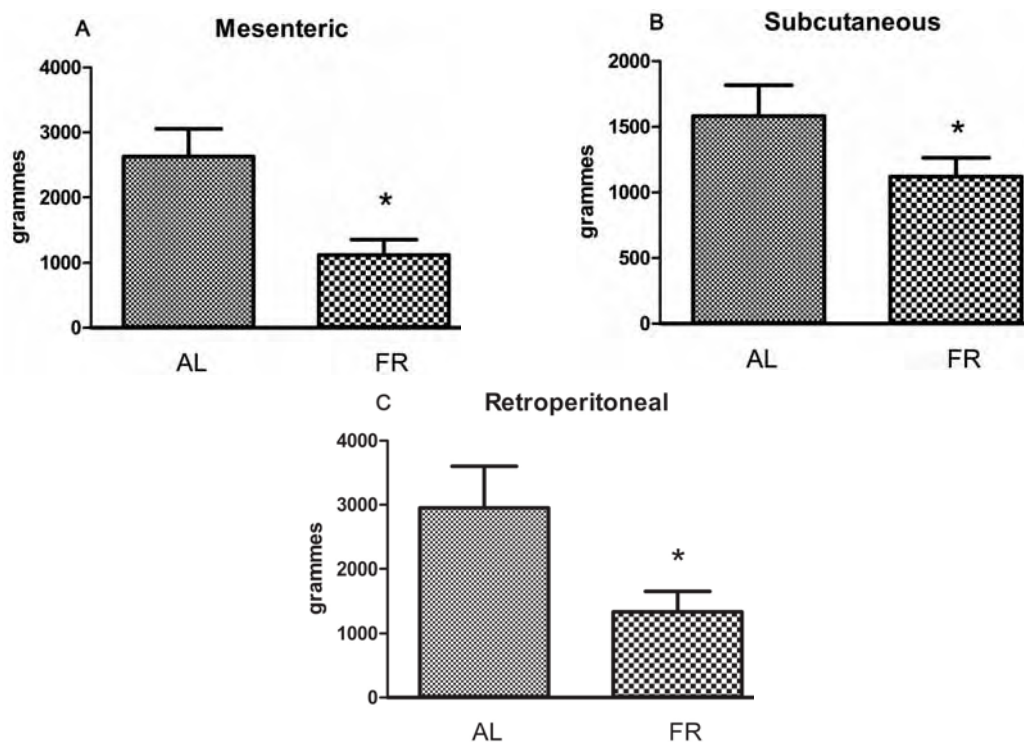


Fig. (4). The weight of adipose tissue from different regions, mesenteric (A), subcutaneous (B) and retroperitoneal (C), at the end of the experiment. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (10 animals/group). * $\neq$ control group.

hormone, when in excess in the circulation (diabetes mellitus type 2), will play an important role by activating the lipogenic transcription factor SREBP (sterol regulatory element-binding protein) [42, 43]. The SREBPs directly activate the expression of approximately 30 genes dedicated to the synthesis and uptake of cholesterol, fatty acids, triglycerides and phospholipids and of NADPH, a cofactor required for the synthesis of these molecules [44, 45]. Though three SREBPs were found in the liver, SREBP-1c is preferentially more active by increasing the transcription of genes involved in fatty acid synthesis, including genes that encode for the enzymes acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase. The first enzyme converts acetyl-CoA to malonyl-CoA and the second converts malonyl-CoA to palmitate [44] contributing to the accumulation of fat in the liver and consequently to the installation of nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

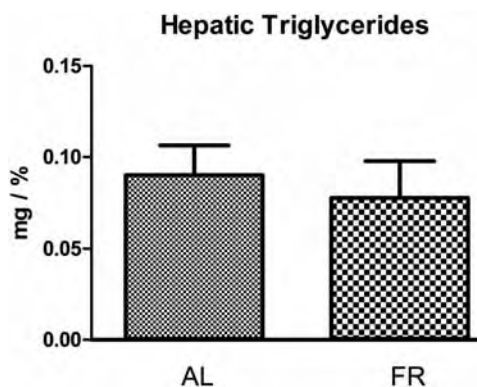


Fig. (5). The concentrations of fat in the livers at the end of experiment. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (10 animals/group).

NASH is characterised by fat accumulation in the liver and can lead to inflammation in the organ until fibrosis occurs [3-7]. IR will contribute to the development of NASH; in individuals resistant to insulin, the SREBP-1c levels are elevated due to high levels of the hormone [46]. Similarly, the SREBP-1c levels are elevated in the livers of ob/ob mice [47, 48]. Despite the presence of insulin resistance in peripheral tissues, insulin activates transcription of SREBP-1c in the livers of rats. The high levels of nuclear SREBP-1c increase the expression of lipogenic genes, fatty acid synthesis and an accumulation of triglycerides in the liver [48, 49]. In our study, four weeks were not sufficient for the development of IR, but it was seen that for a 1% decrease in body weight, insulin sensitivity increased 0.67% and hepatic fat accumulation decreased 0.67%. This may be due to a decreased supply of calories from the dietary restriction, which leads to a reduced production of insulin by the pancreas. There is a consequential decrease in the activation of SREBPs in the adipose tissue and liver, thus reducing the amounts of fat substrate in these tissues [42, 44, 48, 49, 50].

CONCLUSION

From the observed results, we can conclude that four weeks were not sufficient for the development of IR and that dietary restriction, which does not cause malnutrition, improves insulin sensitivity and minimises the fatty accumulation on body and liver in both eutrophic rats.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All of the authors contributed to the study not only with the sample collections but also with the preparation of this manuscript. All of the authors have read and approved of the final version of this manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the technicians from the Laboratory of Biodynamics, Department of Physical Education, UNESP, Rio Claro campus, Clarice Sibuya and José Roberto Rodrigues for their essential support. In addition, the authors would like to thank the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for their financial support.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ABBREVIATIONS

IR	=	Insulin Resistance
TNF- α	=	Tumour Necrosis Factor
IRS-1	=	Insulin Receptor Substrate-1
SREBP	=	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
NAFLD	=	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
ITT	=	Insulin Tolerance Test
Kitt	=	Removal Rate of Serum Glucose

REFERENCES

- [1] Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Sem Liver Dis* 1999; 19: 221-9.
- [2] Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.
- [3] Sheth SG, Fredric D, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Inter Med* 1997; 137: 45.
- [4] Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1136-43.
- [5] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-31.
- [6] Alba LM, Lindor K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 977-86.
- [7] Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-61.
- [8] Burt AD, Mutton A, Day C. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-58.
- [9] Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003; 143: 500-5.
- [10] Louthan MV, Barve S, McClellan CJ, Joshi-Barve S. Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2005; 147: 835-8.
- [11] Polovina S, Micić D. The influence of diet with reduction in calorie intake on metabolic syndrome parameters in obese subjects with impaired glucose tolerance. *Med Pregl* 2010; 63: 465-9.
- [12] Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-600.
- [13] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-9.
- [14] Pardee PE, Lavine JE, Schwimmer JB. Diagnosis and treatment of pediatric nonalcoholic steatohepatitis and the implications for bariatric surgery. *Semin Pediatr Surg* 2009; 18: 144-51.
- [15] Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 587-96.
- [16] Nobili V, Carter-Kent C, Feldstein AE. The role of lifestyle changes in the management of chronic liver disease. *BMC Med* 2011; 9: 70.
- [17] Martin BJIS, Stuart MS, Mattson MP. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(14): 6127-33.
- [18] Goodrick CL. Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, bodyweight, and metabolic rate. *Gerontology* 1980; 26: 22-33.
- [19] Holloszy JO. Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. *J Gerontol* 1993; 48: B97-B100.
- [20] Yu PB, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, Lynd FT. Life span study of SPF fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J Gerontol* 1982; 37: 130-41.
- [21] Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 1986; 116: 641-54.
- [22] Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 1982; 15: 1415-8.
- [23] Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 361-9.
- [24] Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 129-37.
- [25] Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444: 868-74.
- [26] Shalileh M, Shidfar F, Haghani H, Eghtesadi S, Heydari I. The influence of calcium supplement on body composition, weight loss and insulin resistance in obese adults receiving low calorie diet. *J Res Med Sci* 2010; 15: 191-201.
- [27] Moura LP, Chiyoda A, Teixeira CVL, *et al.* Effects of Exercise and Cinnamon Extract on Blood Chemistry of Type 1 Diabetic Rats. *J Exerc Physiol Online* 2010; 13: 4.
- [28] Botezelli JD, Moura RF, Dalia RA, *et al.* Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *Lipids Health Dis* 2010; 9: 116.
- [29] Lundbaek K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962; 3: 1057-513.
- [30] Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP, Hirata RD. Métodos de bioquímica clínica. São Paulo: Pancast 1990.
- [31] Almeida PBL, Mello MAR. Fetal/neonatal protein restriction, insulin action and glucose homeostasis in adult life: effects of fasting and cute exercise. *Rev Bras Educ Fis Esporte* 2004; 18: 17-30.
- [32] Voltarelli FA, Camargo PB, Mello MAR, *et al.* The validity of the lactate minimum test adapted to rats. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 443.
- [33] Gobatto CA, Kokubun E, Sibuya C, Mello MAR. Efeitos da desnutrição protéica calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após teste de cargas progressivas. *SBPC* 1991; 43: 725-6.
- [34] Kraemer WT, Volek JS, Clark KL, *et al.* Influence of exercise training on physiological and performance changes with weight loss in men. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 21: 1320-9.
- [35] Schutz Y. Macronutrient and energy balance in obesity. *Metabolism* 1995; 44: 7-11.
- [36] Pereira LO, Francischi RP, Klopfer M, *et al.* Obesidade e suas implicações – ação da atividade física e controle nutricional. *Rev Bras Nutr Clin* 1999; 14: 9-17.
- [37] Pritchett CE, Hajnal A. Obesogenic diets may differentially alter dopamine control of sucrose and fructose intake in rats. *Physiol Behav* 2011; 104: 111-6.
- [38] Hermsdorff HHM, Monteiro JBR, Mourão DM, Leite MCT. Termogênese induzida pela dieta: uma revisão sobre seu papel no balanço energético e no controle de peso. *Rev Bras Nutr Clin* 2003; 18: 37-41.
- [39] Barzilai N, Gupta G. Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54: 89-96.
- [40] Kissebah AH. Insulin resistance in visceral obesity. *Int J Obes* 1991; 15: 109-15.
- [41] Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991; 14: 1132-43.
- [42] Horton ES. Metabolic aspects of exercise and weight reduction. *Med Sci Sports Exerc* 1985; 18: 10-8.

- [43] Ferre P, Foufelle. Fator de transcrição-SREBP e homeostase lipídica: perspectiva clínica. *Horm Res* 2007; 68: 72-82.
- [44] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-40.
- [45] Sakakura Y, Shimano H, Sone H, *et al.* Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 176-83.
- [46] Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(4): 419-25.
- [47] Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274: 30028-32.
- [48] Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401: 73-6.
- [49] Anthonen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties *in vitro*. *J Biol Chem* 1998; 273: 215-21.
- [50] Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Gen Dev* 2003; 17: 313-21.

Received: September 25, 2011

Revised: December 27, 2011

Accepted: January 12, 2012

© de Moura *et al.*; Licensee Bentham Open

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

4.6 Artigo 6: O presente projeto de pesquisa, utilizando a dieta AIN-93M como controle, não apresentou diferença significativa no acúmulo de gordura hepática para os animais dos grupos sedentários (Controle e Hiperlipídico) e uma vez que os dados obtidos neste projeto não corroboraram com os dados encontrados no estudo tido como piloto (Artigo 1) onde a ração comercial Purina foi utilizada, o presente estudo teve como objetivo além de avaliar as alterações metabólicas decorrentes de duas dietas tidas como controle (AIN-93M e Ração comercial Purina[®]) no acúmulo de gordura hepática, objetivou também avaliar os efeitos causados pela restrição alimentar nesses animais.

Publicado – Moura et al. *Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. Lipids in health and disease*, v. 11, p. 10.1186/1476-51, 2012.

RESEARCH

Open Access

Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat

Leandro P Moura*, Gabriella A Figueredo, Natália O Bertolini, Marília Ceccato, Jessica R Pereira, Amanda Christine S Sponton and Maria Alice R de Mello

Abstract

Background: Studies using laboratory animals under what are considered to be “standard” conditions normally offer unrestricted amounts of food to the animals, which can lead to metabolic disorders. Moreover, standard diets have different compositions.

Aim: Therefore, the aim of the present study was to assess the effects of two non-isocaloric diets (commercial Purina® and AIN-93M), which are considered standard diets, on the accumulation of fat in the liver of rats when offered ad libitum or in a restricted amount.

Methods: Thus, 40 Wistar rats (90 days old) were separated into 4 groups according to the amount of food offered (ad libitum or dietary restriction) and the type of diet (commercial diet, 3,028.0 kcal/g or AIN-93M, 3,802.7 kcal/g): animals fed the commercial Purina® diet ad libitum (AP), animals fed restricted amounts of the commercial Purina® diet (RP), animals fed the AIN-93M diet ad libitum (AD), and animals fed restricted amounts of the AIN-93M diet (RD). Dietary restriction consisted of pair-feeding the RP and RD groups with 60% of the total food consumed by the corresponding ad libitum groups.

Results: Because of its higher carbohydrate and calorie content, AIN-93M was found to accelerate weight gain, reduce glucose tolerance and peripheral insulin sensitivity, and increase the amount of fat in the liver when compared to the commercial diet. Conversely, a 40% dietary restriction assisted in weight loss without causing malnutrition, contributing to an improved glucose tolerance and higher levels of HDL cholesterol.

Conclusion: Therefore, differences in the amount of carbohydrates and calories provided by the diet can lead to important metabolic disorders, such as impaired tolerance and accumulation of hepatic fat, and dietary restriction improves serum and tissue lipid profiles in laboratory animals.

Keywords: Non-isocaloric diets, Dietary restriction, Non-alcoholic fatty liver disease

Background

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterised by the presence of fat droplets in the liver [1,2]. Lipid levels equal to or greater than 5% of an organ's weight [1,3] characterises steatosis, which may range from simple fat accumulation without any evidence of inflammation to necroinflammatory manifestations, including steatohepatitis. Steatohepatitis, in turn, may progress to fibrosis in 50% of cases, to cirrhosis in 15% of cases, and to liver failure in 3% of cases [4-8].

Hepatic fat accumulation can be found in 57.5 to 75% of obesity cases [6] due to alterations such as an increase in fat consumption, a decrease in oxidation, and lipid secretion by the liver [9] or other mechanisms such as oxidative stress, the organism's inflammatory response, and insulin resistance (IR) [10,11]. Increased carbohydrate consumption may lead to IR [12], where peripheral tissues show an abnormal response to insulin that may lead to glucose intolerance [13] and, consequently, to NAFLD [14-17].

The key for reducing the disorders that stem from insulin resistance, glucose intolerance, and NAFLD is a change in lifestyle, including regular participation in physical activity and caloric restriction [18-21].

* Correspondence: leandropereiram@hotmail.com
Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24ª n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Rio Claro, Zip code: 13506-900, SP, Brazil

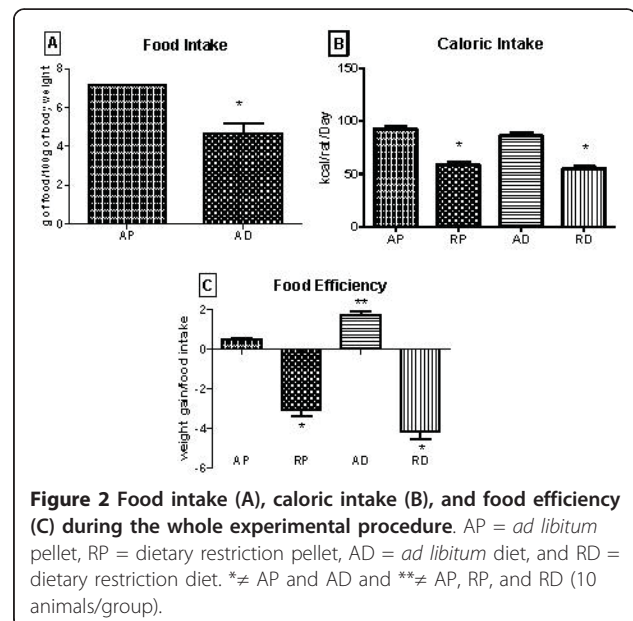
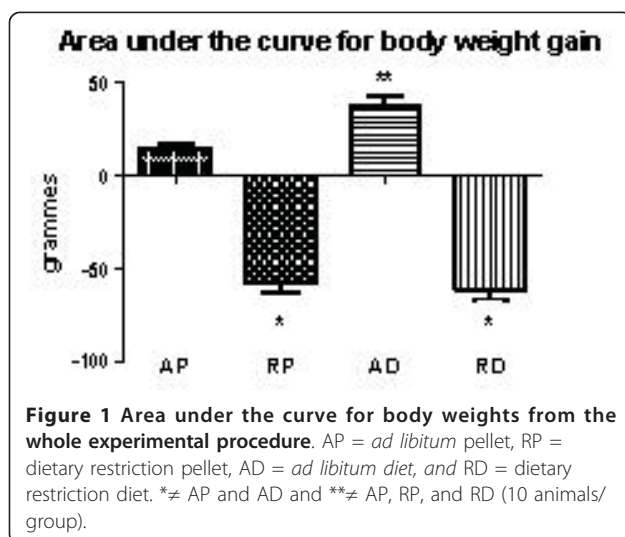
Given the limitations of research involving humans, animal models, in particular rodents, have become important research tools for several areas of science.

Two types of “standard diets”, a commercial diet for rodents (Purina®) and a diet proposed by the American Institute of Nutrition (AIN), AIN-93 [22], are often used in physiological research studies that use rodents as experimental models. The problem with labelling these two diets as standard diets is the difference in their caloric values, which is approximately 800 kcal/g (Purina®: 3,028.0 kcal/kg and AIN-93M: 3,802.7 kcal/kg). This discrepancy is mainly due to differences in the amount of sugar present in each diet (Purina: 437 g/kg and AIN-93M: 700 g/kg). As previously noted, a high carbohydrate intake contributes to the development of metabolic disorders and may induce NAFLD. Therefore, the aim of the present study was to assess the effects of two non-isocaloric diets considered to be standard (commercial Purina® and AIN-93M) for studies involving rodents as experimental models, offered *ad libitum* or in restricted amounts on the development of non-alcoholic fatty liver disease in rats.

Results

Animals fed *ad libitum* had higher weights than animals subjected to dietary restriction. When comparing both *ad libitum* groups, the group of animals fed the AIN-93M diet (AD group) was shown to have a larger weight gain (Figure 1).

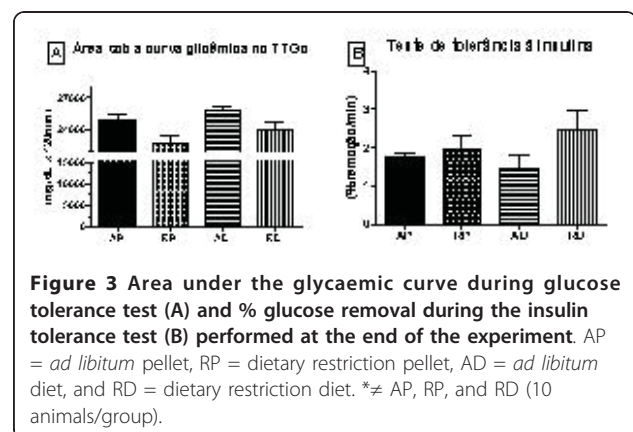
Food intake was lower in the AD group when compared to the AP group (Figure 2A). Regarding caloric intake, the amount of calories ingested by the groups subjected to dietary restriction was smaller than that of the *ad libitum* groups, as was expected (Figure 2B). The AIN-93M diet was shown to have a higher food efficiency than the commercial diet (Figure 2C).



Groups subjected to the dietary restriction presented a smaller area under the glucose curve during the oral glucose tolerance test (OGTT) (Figure 3A). However, when analysing the insulin tolerance test (ITT), no significant differences could be observed between the groups (Figure 3B).

Regarding the amount of triglycerides contained in the subcutaneous (Figure 4A) and retroperitoneal (Figure 4B) adipose tissues, the AD group was found to have a higher triglyceride concentration when compared to the other groups. As for the mesenteric adipose tissue (Figure 4C), it was possible to observe a decrease in the triglyceride content in the groups subjected to dietary restriction.

The AD group presented higher concentrations of total hepatic fat when compared to the dietary restriction groups, and a tendency for an increase was noted when compared to the AP group ($p = 0.067$) (Figure 5).



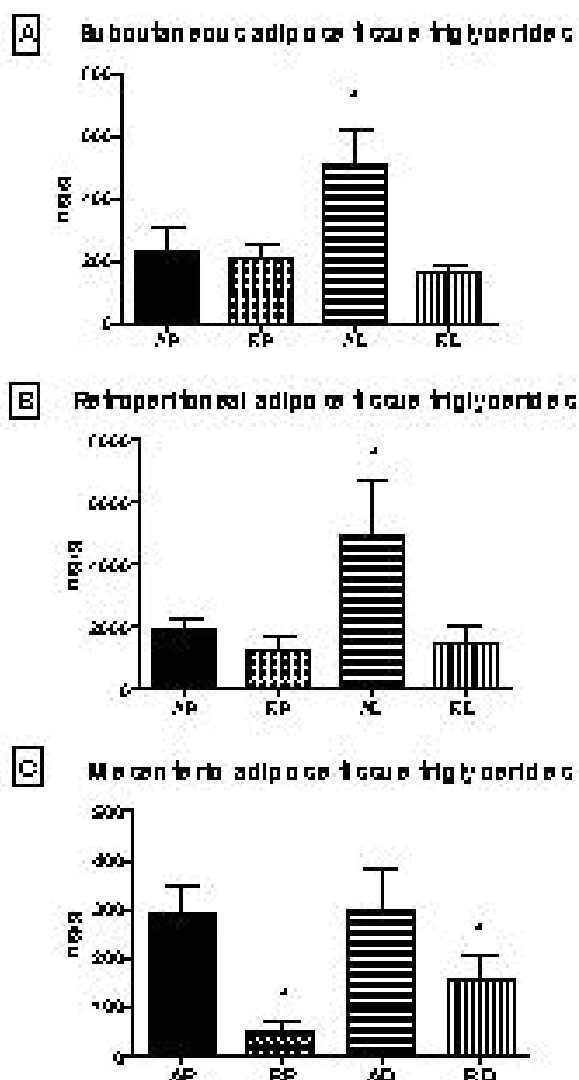


Figure 4 Triglyceride concentrations of different adipose tissue depots, subcutaneous (A), retroperitoneal (B), and mesenteric (C), at the end of the experiment. AP = *ad libitum* pellet, RP = dietary restriction pellet, AD = *ad libitum* diet, and RD = dietary restriction diet. * $\neq$ AP and AD, *** $\neq$ AP, RP, and RD (10 animals/group).

Regarding the serum biochemistry, a greater concentration of HDL cholesterol could be observed in the groups subjected to the dietary restriction. No significant differences in LDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides, glucose, total serum protein, and serum albumin levels could be observed among the studied groups (Table 1).

Discussion

Because there appears to be little concern with respect to the best way to feed animals used as “controls” in many scientific studies involving animal models, the

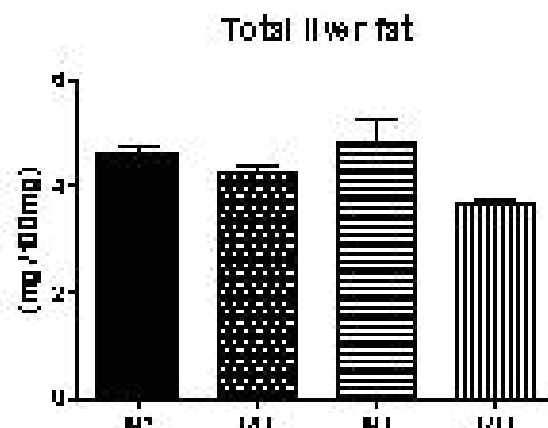


Figure 5 Total hepatic fat concentrations at the end of the experiment. AP = *ad libitum* pellet, RP = dietary restriction pellet, AD = *ad libitum* diet, and RD = dietary restriction diet. (10 animals/group).

present study aimed to assess the metabolic effects of dietary restriction in rats associated with the administration of two non-isocaloric diets (commercial Purina® diet and semi-purified AIN-93M diet) that are considered standard diets for rodents. The main results of this study demonstrate that a 40% dietary restriction reduced weight gain without causing malnutrition, improved glucose tolerance, and increased the levels of circulating HDL cholesterol. The AIN-93M diet increased weight gain, reduced glucose tolerance, and led to the accumulation of fat in the liver when compared to the commercial diet due to its higher caloric and carbohydrate contents.

Serum albumin and total serum proteins were determined to assess the animals’ nutritional statuses [23-25]. According to these results, animals subjected to the dietary restriction described in this study did not present malnutrition, given that no alterations in serum albumin and total serum proteins could be observed in any of the animals.

Regarding the serum lipid profile, increased levels of HDL cholesterol could be observed in the groups subjected to dietary restriction, demonstrating that a 40% dietary restriction does not cause malnutrition; this finding is in accordance with other studies [21-26], which also showed improvements in the lipid profiles of the animals.

In the present study, animals belonging to the *ad libitum* groups showed a larger weight gain when compared to animals in the groups subjected to dietary restriction. Animals fed the AIN-93M diet, which contains greater amounts of carbohydrates (26.3%) and calories (800 kcal/g of diet) [22] than the commercial diet, gained more weight when compared to those maintained with

Table 1 Serum data obtained at the end of the experimental period

	AP	RP	AD	RD
HDL (mg/dL)	32.65 ± 3.07	38.35 ± 4.44*	31.50 ± 4.22	41.62 ± 3.91*
LDL (mg/dL)	36.43 ± 7.08	51.38 ± 8.11	42.96 ± 12.57	52.31 ± 7.76
TG (mg/dL)	101 ± 31.54	105.85 ± 27.02	96.64 ± 20.2	89.31 ± 28.75
Total Cholesterol (mg/dL)	65.56 ± 10.29	74.69 ± 11.79	62.44 ± 18.27	76.03 ± 11.28
Glucose (mg/dL)	82.97 ± 10.53	91.27 ± 23.21	90.17 ± 16.28	106.95 ± 15.86
Total Protein (g/dL)	6.79 ± 0.51	6.79 ± 0.16	6.85 ± 0.3	6.97 ± 0.26
Albumin (g/dL)	2.80 ± 0.39	2.75 ± 0.09	2.90 ± 0.15	2.91 ± 0.13

Data are expressed as mean ± standard deviation.

AP = *ad libitum* purina; RP = dietary restriction purina; AD = *ad libitum* diet, and RD = dietary restriction diet. * $\neq$ AP and AD (10 animals/group).

the commercial diet, when allowed to feed *ad libitum*. However, when subjected to dietary restriction, the effect of the diet on weight gain was inhibited.

The accumulation of body fat resulting from increased carbohydrate intake occurs due to the fact that excess carbohydrates, when not used by the organism, are initially degraded into pyruvate and then attached to coenzyme A (CoA) to become acetyl-CoA. Acetyl-CoA is transformed into malonyl-CoA with the help of the enzyme acetyl-CoA carboxylase. The fatty acid synthase enzyme then converts malonyl-CoA into palmitate. Following the esterification of palmitate with the α -glycerol phosphate in adipose tissue, triacylglycerol is formed and stored as an energy reserve [28].

The effects of both diets on the accumulation of body fat are more pronounced when analysing the total triglyceride concentrations of the three main fat depots in the organism (mesenteric, subcutaneous, and retroperitoneal). The effect of the high-calorie diet, AIN-93M, on stimulating the accumulation of fat when compared to the commercial diet became evident, as did the effect of dietary restriction in modulating such an accumulation.

Regarding the analysis of food consumption in the *ad libitum* groups, the AD group ingested smaller amounts of food than did the AP group. These data are in accordance with other studies [29], where rats fed high-calorie diets presented a lower food intake. However, no significant difference regarding caloric intake could be observed among the studied groups.

When considering food efficiency, meaning the animal's ability to transform ingested calories into body weight [30,31], animals belonging to the groups subjected to dietary restriction showed negative values, which were considered beneficial given that the aim of dietary restriction was to minimise weight gain. When comparing *ad libitum* groups, the animals that were fed the AIN-93M diet (AD) were more efficient in transforming ingested energy into body mass.

It is known that the accumulation of adipose tissue can lead to insulin resistance, given that the adipose tissue is an endocrine organ that secretes several pro-

inflammatory substances that may interfere in the hormone's signalling pathway and lead to a resistance to its actions [32-34]. The present study showed that the greater weight gain observed in the *ad libitum* groups compared to the groups subjected to dietary restriction was not sufficient to cause insulin resistance. This may be because these rats were not obese and showed a normal weight gain for their age [35]. Conversely, when assessing glucose tolerance, impairments deriving from the administration of the AIN-93M diet were identified.

The OGTT showed that rats fed the AIN-93M diet *ad libitum* had a lower glucose tolerance when compared to those fed the commercial diet. According to [36,17], the chronic administration of a carbohydrate-rich diet may lead to glucose intolerance. Given this substrate's high availability, if it is not used by the organism, its transformation into fat may cause an increase in the availability of circulating free fatty acids and an increase in adipose tissue, as was observed in the present study. This may lead to a malfunction of the insulin-signalling pathway [37]. A tendency for a reduction in peripheral sensitivity to the hormone could be observed in the AD group ($p = 0.064$) when compared to the AP group. If the experimental period had been extended, insulin resistance may have been observed in this group, which would explain the glucose intolerance.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterised by the accumulation of fat in the liver, which may lead to inflammation, fibrosis, and organ failure [4-8]. There is no specific treatment for this disease to date. Therefore, it is clear that research involving laboratory animals is of great importance to increasing knowledge about this disease [38].

It is known that hepatic lipogenesis is activated following the consumption of carbohydrates because the resulting increase in insulin secretion activates the lipogenic transcription factor, SREBP-1c [39,40]. In individuals with insulin resistance, the situation is aggravated by increased circulating insulin levels, which stimulate the synthesis of triglycerides and increases the secretion

of VLDL cholesterol, contributing to a greater accumulation of fat in the liver [12].

No significant differences in the accumulation of hepatic fat were observed in the present study, though a strong statistical tendency could be noted ($p = 0.067$). If the experiment was extended, it may have shown that the AIN-93M diet would most likely lead to insulin resistance and, consequently, a greater accumulation of fat in the liver due to its high carbohydrate content when compared to the commercial Purina[®] diet [12].

Conclusion

The present study illustrates that differences in the amounts of carbohydrates and calories provided in a diet may lead to important metabolic changes, such as impaired tolerance and accumulation of hepatic fat, and that dietary restriction improves serum and tissue lipid profiles in laboratory animals.

Materials and method

Animal treatment

Forty Wistar rats, which were 90 days old at the beginning of the study, were housed in polyethylene cages measuring $37 \times 31 \times 16$ cm (five rats per cage), at room temperature (25°C) with a 12-hour light/dark photoperiod. All procedures performed on the animals were submitted to and approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) of the Institute of Biosciences at UNESP, Rio Claro campus (Process number: 2011/6274).

Experimental design and groups

The animals were separated, according to the dietary protocol, into four groups (10 per group): animals fed the commercial Purina[®] diet *ad libitum* (AP), animals fed restricted amounts of the commercial Purina[®] diet (RP), animals fed the AIN-93M diet *ad libitum* (AD), and animals fed restricted amounts of the AIN-93M diet (RD).

The daily food consumption of the AP and AD animals was recorded. The following day, animals in the dietary restriction groups were pair-fed an amount equivalent to 60% of the previous day's average intake of the respective *ad libitum* group. This protocol was chosen because it provides dietary restriction without causing malnutrition and increases the animal's quality of life [41-45]. All animals were offered free access to water, regardless of their group.

Diet Compositions

Commercial Purina[®] Diet (Paulínia/SP, Brazil): This diet was composed of 43.7% carbohydrates, 23% protein, and 4% fat at 3,028 kcal/g. The remainder of the ingredients were comprised of minerals, fibre, and vitamins.

AIN-93M (Semi-purified diet, according to the American Institute of Nutrition, AIN-93M [22]): The diet was composed of 70% carbohydrates, 14% protein, and 4% fat at 3,802.7 kcal/g. The remainder of the ingredients were comprised of minerals, fibre, and vitamins.

Oral Glucose Tolerance Test - OGTT

An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed on the animals at the end of the experiment after a 12-hour fast. An initial blood sample was obtained through a small cut at the end of the animal's tail. A glucose solution (80%) was then administered to each animal in the amount of 2 g/kg of body weight using a polyethylene gastric tube. Blood samples were collected 30, 60, and 120 minutes later using heparinised capillaries calibrated to 25 μ L for determining glucose concentrations. A single cut at the end of the tail was sufficient for all sample collections. Blood glucose concentrations were determined by the glucose oxidase method using commercial kits (Laborlab[®]). Results were analysed by calculating the area under the glucose curve using the trapezoidal method [46] with the help of the Origin 6.0 software (2000).

Insulin Tolerance Test - ITT

Insulin sensitivity was evaluated through the insulin tolerance test (ITT). The ITT was performed at the end of the experiment and 48 hours after the OGTT. An initial blood sample was obtained by making a cut at the end of the animal's tail (time 0). An insulin solution, at the dose of 150 mU/100 g body weight, was then administered through an intraperitoneal injection. New blood samples were obtained after 4, 8, 12, 16, and 20 minutes using heparinised capillaries calibrated to 25 μ L for determining the glucose concentrations by using commercial kits (Laborlab[®]). A single cut at the end of the tail was sufficient for all sample collections. The results obtained were analysed by calculating the glucose removal rate (KITT). KITT was expressed as %/minute and was calculated using the formula $(0.0693/t_{1/2}) \times 100$. Glucose removal ($t_{1/2}$) was calculated by a least squares analysis of the curve of the blood glucose levels during the period of insulin decay following its administration [47], using the Origin 6.0 software.

Evaluation of the nutritional state

Body mass and food intake were recorded daily throughout the experimental period. The results were analysed by calculating the areas under the curves for body mass and food intake throughout the experiment using the trapezoidal method [48]. Food efficiency was calculated to evaluate the animal's ability to convert consumed food energy into body weight. This calculation was made according to the World Health Organization [30],

by dividing the average weekly weight gain of animals within each box (g) by the total energy intake (kcal). The energy intake was calculated by multiplying the amount of food ingested by the caloric value of each diet.

At the end of the experiment, all animals were anaesthetised with CO₂ prior to being euthanised by decapitation. Blood samples were collected for the determination of blood glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL cholesterol and HDL cholesterol levels by using commercial kits (Laborlab®, São Paulo/Brazil) and for total serum protein and serum albumin measurements. Samples for determining total lipids were also collected from the liver and from different depots of adipose tissue (mesentery, subcutaneous, and retroperitoneal) for triglyceride analysis [49].

Statistics

The normality of the data was confirmed by the Shapiro-Wilk test. The results are presented as mean ± standard deviation. Comparisons between groups were made through an analysis of variance (one-way ANOVA) and the Newman-Keuls post-hoc test when necessary. A predetermined 5% significance level was used for all the analyses. The statistical programme used was the SPSS 17.0.

List of abbreviations

NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; IR: insulin resistance; AIN: American Institution of Nutrition; oGTT: oral glucose tolerance test; ITT: insulin tolerance test.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technicians from the Laboratory of Biodynamics, Department of Physical Education, UNESP, Rio Claro campus, Clarice Sibuya and José Roberto Rodrigues, for their essential support. In addition, the authors would like to thank the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for their financial support. They would also like to thank Corn Products Brasil® for the donation of supplies for the production of the diet used in this study.

Authors' contributions

All of the authors contributed to the study, not only with regard to sample collections but also with regard to the preparation of this manuscript. All of the authors have read and approved of the final version of this manuscript.

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the present study.

Received: 15 November 2011 Accepted: 5 January 2012
Published: 5 January 2012

References

- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ: **Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.** *Mayo Clin Proc* 1980, **55**:434-438.
- Diehl AM: **Nonalcoholic Steatohepatitis.** *Sem Liver Dis* 1999, **19**:221-229.
- Gaudio AD, Boschi L, Gaudio GAD: **Liver change in obese patients.** *Obesity Surgery* 2000, **802**:804.
- Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM: **Non-alcoholic fatty liver disease: an overview.** *J Gastroenterol Hepatol* 2002, **17**:1136-43.
- Sheth SG, Fredric D, Chopra S: **Nonalcoholic Steatohepatitis.** *Ann Inter Med* 1997, **1997**:137-145.
- Angulo P: **Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *N Engl J Med* 2002, **346**:1221-1231.
- Alba LM, Lindor K: **Review article: non-alcoholic fatty liver disease.** *Aliment Pharmacol Ther* 2003, **17**:977-986.
- Utzschneider KM, Kahn SE: **Review: The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:4753-4761.
- Burt AD, Mutton A, Day C: **Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis.** *Semin Diagn Pathol* 1998, **15**:246-258.
- Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE: **Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease.** *J Pediatr* 2003, **143**:500-505.
- Louthan MV, Barve S, McClain CJ, Joshi-Barve S: **Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease.** *J Pediatr* 2005, **147**:835-838.
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL: **Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice.** *Mol Cell* 2000, **6**:77-86.
- Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA: **Contribuições da disfunção das células beta, resistência à insulina e na patogênese da tolerância à glicose diminuída e glicemia de jejum alterada.** *Diabetes Care* 2006, **29**:1130-1139.
- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH: **Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1.** *Science* 2008, **320**:1492-1496.
- Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, Deedwania PC: **Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications.** *Cardiol Clin* 2004, **22**:485-504.
- Ginsberg HN: **Insulin resistance and cardiovascular disease.** *Jornal Clin Investigation* 2000, **106**:453-458.
- Li J, Chi Y, Wang Chunjiang, Wu J, Yang H, Zhang D, Zhu Y, Wang N, Yang J, Guan Y: **Pancreatic-derived factor promotes lipogenesis in the mouse liver: Role of the Forkhead box 1 signaling pathway.** *Hepatology* 2011, **53**:1906-16.
- Pardee PE, Lavine JE, Schwimmer JB: **Diagnosis and treatment of pediatric nonalcoholic steatohepatitis and the implications for bariatric surgery.** *Semin Pediatr Surg* 2009, **18**:144-151, 2009.
- Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H: **Pharmacological Interventions for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults and in Children: A Systematic Review.** *J Pediatr Gastr Nutr* 2009, **48**(5):587-96.
- Nobili V, Carter-Kent C, Feldstein AE: **Role of Lifestyle Changes in the Management of Chronic Liver Disease.** *BMC Med* 2011, **6**:70, 2011.
- González O, Tobia C, Ebersole J, Novak M: **Caloric restriction and chronic inflammatory diseases.** *Oral Dis* 2011, **10**:1111/j.1601-0825.2011.01830.x.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nutr* 1993, **123**:1939-1951.
- Almeida PBL, Mello MAR: **Fetal/neonatal protein restriction, insulin action and glucose homeostasis in adult life: effects of fasting and cute exercise.** *Rev bras educ fis esporte* 2004, **18**(1):17-30.
- Voltarelli FA, Mello MAR, Camargo PB, Paiva MF, Oliveira CAM, Gobatto CA: **The validity of the lactate minimum test adapted to rats.** *Med Sci Sports Exerc* 2005, **37**:S443.
- Gobatto CA, Kokubun E, Sibuya C, Mello MAR: **Efeitos da desnutrição protéico calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após teste de cargas progressivas.** *SBPC* 1991, **43**(7):725-726.
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D: **The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake.** *J Nutri* 1986, **116**:641-654.
- Pedrosa RG, Tirapegui J, Rogero MM, Castro IA, Pires ISO, Oliveira AAM: **Influência do exercício físico na composição química da massa corporal**

- magra de ratos submetidos à restrição alimentar. *Braz J Pharm Sci* 2004, **40**(1):27-34.
28. Guyton AC, Hall JE: *Tratado de Fisiologia Médica* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
 29. Nascimento AF: "INFLUÊNCIA DAS DIETAS PADRÃO E HIPERCALÓRICA SOBRE O COMPORTAMENTO CORPORAL E BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR". *PhD thesis* Universidade Estadual Paulista, Medicine Department; 2006.
 30. Benson BN, Calven CC, Roura E, Klasing KC: Dietary energy source and density modulate the expression of immunologic stress in chicks. *J Nutr* 1993, **123**:1714-1723.
 31. Arthur PF, Archer JA, Johnston DJ, Herd RM, Richardson EC, Parnell PF: Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. *JAS* 2001, **79**:2805-2811.
 32. Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S: Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 2008, **134**:1369-1375.
 33. Madeira IR, Carvalho CNM, Gazolla FM, Pinto LW, Borges MA, Bordallo MAN: O impacto da obesidade sobre os componentes da síndrome metabólica e as adipocitoquinas em crianças pré-púberes. *J Pediatr* 2009, **85**(3).
 34. Liu Q, BENCHMARK S, Qu S: The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis* 2010, **9**:42.
 35. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P: A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003, **133**:1081-7.
 36. Belkacemi L, Selselet-Attou G, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ: Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in sand rats. II. In vivo investigations. *Int J Mol Med* 2010, **26**:759-65.
 37. Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002, **32**:14-23.
 38. Koek GH: Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 2006, **82**:315-322.
 39. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Jornal Clin Invest* 2002, **109**:1125-1131.
 40. Ferre P, Foulle : Fator de transcrição-SREBP e homeostase lipídica: perspectiva clínica. *Horm Res* 2007, **68**:72-82.
 41. Weindrich R: The retardation of aging by caloric restriction: Studies in rodents and primates. *Toxicol Pathol* 1996, **24**:742-745.
 42. Mattson MP, Wan R: Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 2005, **16**:129-137.
 43. Weindrich R, Naylor PH, Goldstein AL, Walford RL: Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J Gerontol* 1988, **43**(2):B40-2.
 44. Yu PB, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, Lynd FT: Life Span Study of SPF Fischer 344 Male Rats Fed AdLibitum or Restricted Diets: Longevity, Growth, Lean Body Mass and Disease. *J Gerontol* 1982, **37**:130-141.
 45. Heilbronn LK, Ravussin E: Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003, **78**(3):361-9.
 46. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 1990, **27**:230-235.
 47. Lundbaek K: Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962, **3**:1057-1513.
 48. World Health Organization - WHO: Obesity and overweight. Geneva; 2004 [http://www.who.int/dietphysicalactivity/].
 49. Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP: Sangue-parte I: Glicídios. In *Métodos de bioquímica clínica*. Edited by: Nogueira DM. et al. São Paulo: Pancast; 1990:153-168.

doi:10.1186/1476-511X-11-2

Cite this article as: Moura et al.: Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. *Lipids in Health and Disease* 2012 **11**:2.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.7 Artigo 7: Visto que há diferença significativa na quantidade de carboidratos entre duas dietas tidas como controle e tendo este nutriente como um dos principais substratos energéticos durante o exercício físico, o presente estudo além de avaliar os efeitos dessas duas dietas controles na capacidade aeróbia bem como na anaeróbia, avaliou também os efeitos da restrição alimentar nestes animais.

Publicado – Moura et al. *Feed restriction and a diet's caloric value: The influence on the aerobic and anaerobic capacity of rats. Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v. 9, p. xx-xx, 2012.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Feed restriction and a diet's caloric value: The influence on the aerobic and anaerobic capacity of rats

Leandro Pereira de Moura^{1,3*}, Carlos Augusto Kalva-Filho², João Paulo Loures², Maria de Sousa Silva², Lucas Pilla Zorzetto¹, Marcelo Costa Junior¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Rodrigo Augusto Dalia¹ and Maria Alice Rostom de Mello¹

Abstract

Background: The influence of feed restriction and different diet's caloric value on the aerobic and anaerobic capacity is unclear in the literature. Thus, the objectives of this study were to determine the possible influences of two diets with different caloric values and the influence of feed restriction on the aerobic (anaerobic threshold: AT) and anaerobic (time to exhaustion: Tlim) variables measured by a lactate minimum test (LM) in rats.

Methods: We used 40 adult Wistar rats. The animals were divided into four groups: *ad libitum* commercial Purina[®] diet (3028.0 Kcal/kg) (ALP), restricted commercial Purina[®] diet (RAP), *ad libitum* semi-purified AIN-93 diet (3802.7 Kcal/kg) (ALD) and restricted semi-purified AIN-93 diet (RAD). The animals performed LM at the end of the experiment, 48 h before euthanasia. Comparisons between groups were performed by analysis of variance ($p < 0,05$).

Results: At the end of the experiment, the weights of the rats in the groups with the restricted diets were significantly lower than those in the groups with *ad libitum* diet intakes. In addition, the ALD group had higher amounts of adipose tissue. With respect to energetic substrates, the groups subjected to diet restriction had significantly higher levels of liver and muscle glycogen. There were no differences between the groups with respect to AT; however, the ALD group had lower lactatemia at the AT intensity and higher Tlim than the other groups.

Conclusions: We conclude that dietary restriction induces changes in energetic substrates and that *ad libitum* intake of a semi-purified AIN-93 diet results in an increase in adipose tissue, likely reducing the density of the animals in water and favouring their performance during the swimming exercises.

Keywords: Diet, Feed restriction, Lactate minimum

Background

Several authors have studied the effects of caloric restriction on body composition and metabolic variables in both humans [1-3] and animals [4]. Reducing daily feed intake to 20 to 40% below *ad libitum* levels, or providing feed intermittently rather than continuously, has been found to significantly reduce the risk of chronic

degenerative diseases such as cancer, type-II diabetes and kidney diseases, and to prolong the life span of laboratory rats and mice by 40% without causing malnutrition [4-7].

However, excessive dietary restriction can lead to malnutrition and physiological changes that lead to decreases in sympathetic nervous system activity, changes in thyroid metabolism, reductions in insulin concentrations and changes in glucagon, growth hormone and glucocorticoid secretion [8]. Furthermore, these changes may promote the mobilisation of endogenous substrates, leading to increased circulation of

* Correspondence: leandropereiram@hotmail.com

¹Laboratory of Nutrition, Metabolism and Exercise, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 24^a avenue n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

fatty acids and increased protein catabolism (including a reduction in muscle protein - [9]), reflecting the decrease in energy expenditures [8].

According to Vanittalie and Yang [10], additional changes may occur to the protein content of heart muscle fibres. Individuals who have lost a significant amount of weight (30% of initial weight) have reduced cardiac mass, and heart muscle fibre atrophy occurs when dietary restriction is implemented in excess, thus reducing the vital capacity of individuals and potentially impairing aerobic and anaerobic performance. These changes, which occur because of an energy deficit, may lead to vital changes in the body.

Given the limitations on human research, animal models have become very important tools for studying many areas of science, including exercise physiology. The use of overweight and inactive animals as controls can affect the results of studies. Therefore, researchers are currently proposing that new procedures for maintaining laboratory animals be evaluated and implemented in order to assure that the control animals are fed in portions rather than *ad libitum*, and that they have adequate environmental stimulation and physical activity [11].

The use of a "control diet" is fundamentally important to researchers. Two types of "control diets" are frequently used in physiological studies: a commercial rodent diet (Purina®) and a diet proposed by the American Institute of Nutrition in 1993 (AIN-93) [12]. However, these two diets have different caloric contents (Purina®: 3028.0 Kcal/kg and American Institute of Nutrition diet (AIN-93 M): 3802.7 Kcal/kg) that are not usually considered. Moreover, it is important to determine the possible effects of the feeding protocol and the different diets fed to rodents that are used in exercise physiology studies.

The lactate minimum test has been used in exercise physiology studies of both humans [13-16] and rodents [17-19] because it enables researchers to determine aerobic and anaerobic capabilities in a single test [20,21]. However, the possible effects of administering diets with different caloric values and feed restriction on the parameters provided by the lactate minimum test are not well understood in the literature. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of dietary restriction (60% of *ad libitum* intake) of two control diets (commercial Purina® and American Institute of Nutrition diet (AIN-93 M)) on the aerobic and anaerobic capacity of Wistar rats, as determined by the lactate minimum test.

Methods

Animals and animal care

The duration of study was one month and we used 40 Wistar rats that were from 90 days old at the beginning

of the experiment and had body weights of 406.9 ± 39.44 g. The animals were housed in polyethylene cages measuring $37 \times 31 \times 16$ cm (five rats per cage) at room temperature (25°C) with a 12-hour light/dark photoperiod. All procedures involving animals were submitted to and approved by the Ethics Committee on Animal Use in Research of the Biosciences Institute of UNESP, Rio Claro Campus (protocol number: 2011/6274).

The animals were divided into four groups with 10 animals per group, depending on the diet and mode of administration. Two groups had access to commercial feed (Purina®): one *ad libitum* (ALP) and the other restricted (RAP). The two other groups had access to the diet proposed by the American Institute of Nutrition in 1993 (AIN-93 M): one *ad libitum* (ALD) and the other restricted (RAD). Feed intake for the animals in the *ad libitum* groups was recorded daily. Thus, for the animals on feed restriction, feed was offered in an amount corresponding to 60% of the average amount consumed by the *ad libitum* groups the previous day. This protocol was selected to allow for dietary restriction without causing malnutrition [4]. All groups had free access to water.

Diet compositions

Commercial Purina® Diet (Paulínia/SP, Brazil)

This diet was composed of 43.7% carbohydrates, 23% protein, and 4% fat at 3,028 kcal/g. The remainder of the ingredients were comprised of minerals, fibre, and vitamins.

AIN-93M (Semi-purified diet, according to the American Institute of Nutrition, AIN-93M; [12])

The diet was composed of 70% carbohydrates, 14% protein, and 4% fat at 3,802.7 kcal/g. The remainder of the ingredients were comprised of minerals, fibre, and vitamins.

Adaptation to water

Before undergoing the lactate minimum protocol, all the animals were adapted only one time to water. The adaptation occurred over a total period of five continuous days, by placing the animals in shallow water in the tank where the tests occurred. The water temperature was maintained at $31 \pm 1^\circ\text{C}$ [19]. The purpose of the adaptation was to reduce the stress of the animals, without promoting physiological adaptations that result from physical training.

Evaluation of aerobic and anaerobic capacity

To determine acutely aerobic and anaerobic capacity, we used the lactate minimum test, which enabled us to determine both parameters in a single protocol [20,21]. This test consists of an induction phase to hyperlactatemia (anaerobic exercise) followed by progressive exercise.

The induction phase consisted of two efforts with a load equivalent to 13% of the animals' body weight. The first effort lasted 30 s, followed by a 30-s passive recovery period. After the recovery period, the animals performed a maximum effort to obtain the time to exhaustion, considered as the parameter of anaerobic fitness. Nine minutes after the exhaustion period, we collected 25 µl of blood via a cut at the distal end of the tail to determine lactate concentrations.

After collecting the blood, the animals began a progressive phase with an initial intensity of 4.0% of body weight, which was increased by increments of 0.5% of body weight over 5 min intervals. At the end of each stage, 25 µl of blood was collected to determine lactate concentrations. The anaerobic threshold, considered as the parameter for aerobic capacity, was equivalent to the zero derivative of a second-order polynomial fit that was obtained from the relationship between lactate concentrations and the exercise intensity. Consequently, we determined lactate concentrations based on the anaerobic threshold.

During all the efforts, the animals were placed individually in tanks (100 × 80 × 80 cm) containing water at $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Blood samples were collected using calibrated capillary tubes and heparinised, and blood lactate was determined using an enzymatic method [22].

Evaluations conducted during the intervention and before euthanasia

Throughout the experimental period, the body weights (all groups) and feed intakes (*ad libitum* group) were recorded daily using an analytical balance. The results were analysed based on the weight change of the animals (weight change = initial weight - final weight).

Parameters obtained following euthanasia

At the end of the experiment, animals were anaesthetised in a CO₂ chamber, 48 h after measuring the lactate minimum test. Blood was collected directly from the heart via cardiac puncture with disposable needles and syringes. The blood was subsequently centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and the serum supernatant was used to determine glucose, total protein and albumin content [23] using commercially available colorimetric enzymatic kits (Labor-lab, Brazil).

Samples of the gastrocnemius (red and white portions) and soleus muscles were collected and used to assess glycogen [24] and triglyceride content [23]. We also collected liver samples for glycogen [24] and total lipid analyses [23]. All the samples were homogenised in a Polytron® for 20 s at maximum speed. They were then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C prior to the analyses.

Statistical analysis

The normality of the data was confirmed using the *Shapiro-Wilk* test. The results are presented as the mean $\pm$ standard

deviation. Comparisons between groups were performed by analysis of variance (one-way ANOVA) and the Newman-Keuls Post-hoc test when necessary. For all the analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$ (Statistica 7; Statsoft, USA).

Results

During the interventions in this study, the animals from the RAP and RAD groups showed a significant decrease in body weight over the course of the experimental period (Figure 1). However, neither group showed any clinical indications of malnutrition, such as hypoalbuminemia, hypoproteinemia or high lipid content in the liver (LIP_{LIV}).

Nevertheless, animals in the RAD group had significantly lower LIP_{LIV} compared to the ALP and ALD groups ($p < 0.05$) (Table 1). The change in weight during the intervention (weight change = initial weight - final weight) was significantly higher for the ALD group compared to the ALP group (Figure 2). Furthermore, the ALD group had greater amounts of subcutaneous adipose tissue ($p < 0.05$) than the other groups. In contrast, the RAP and RAD groups had significantly less adipose tissue in the mesenteric and retroperitoneal regions compared to the *ad libitum* groups (Table 2).

The levels of liver glycogen (GLYC_{LIV}) in the RAD and RAP groups were significantly higher ($p < 0.05$) than those found in the ALP and ALD groups. Moreover, the quantities of soleus muscle glycogen (GLYC_{SOL}) in the RAP group were also higher than in the ALP and ALD groups ($p < 0.05$). There were no significant differences between the groups with respect to the levels of triglycerides found in the soleus (TG_{SOL}) and gastrocnemius (TG_{GAS}) muscles (Table 3).

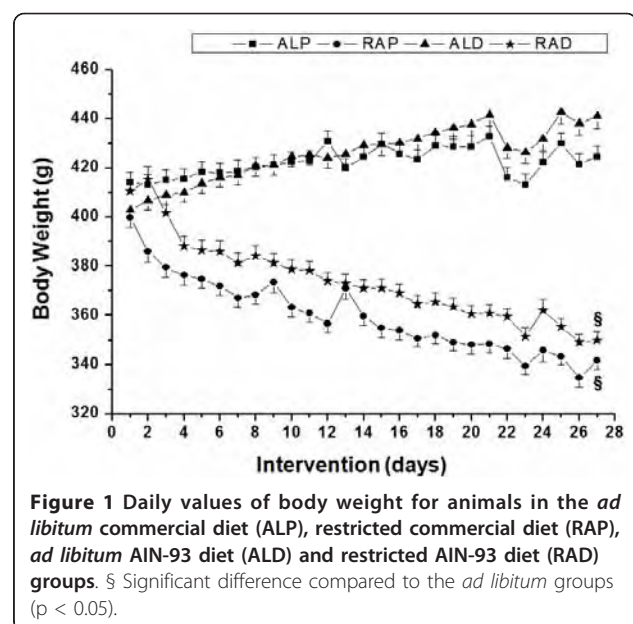


Table 1 Concentrations of albumin, total protein and liver lipids observed in the *ad libitum* and restricted groups

	ALP	RAP	ALD	RAD
ALB	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.1
PRO _{TOTAL}	6.8 ± 0.6	4.2 ± 0.5	4.8 ± 1.3	3.6 ± 0.4
LIP _{LIV}	4.6 ± 0.6	4.2 ± 0.5	4.8 ± 1.2	3.6 ± 0.4 *

ALP *Ad libitum* commercial (Purina®) diet group, RAP Restricted commercial (Purina®) diet group, ALD *Ad libitum* semi-purified AIN-93 diet group, RAD Restricted semi-purified AIN-93 diet group, ALB Concentrations of albumin (g/dL), PRO_{TOTAL} Total protein (g/dL), LIP_{LIV} Liver lipids (mg/100 mg); * Significant difference compared to the ALP group (p < 0.05); *significant difference compared to the ALD group (p < 0.05)

Table 4 shows the values for aerobic capacity, lactate concentrations and anaerobic capacity (time to exhaustion) determined using the lactate minimum test in all the groups studied. The anaerobic threshold values did not differ between the groups, whereas the lactate concentrations values were significantly lower (p < 0.05) in the ALD group compared to other groups. In addition, the ALD group had higher time to exhaustion (p < 0.05) compared to the ALP and RAP groups (Table 4).

Discussion

The principle findings of this study demonstrate that a 40% restriction on the amount of feed offered to the rats did not cause malnutrition in adult Wistar rats over a four-week period. In addition, the caloric difference between the two control diets used (Purina®: 3028.0 Kcal/kg and AIN-93 M: 3802.7 Kcal/kg) did not cause changes in the levels of muscle and liver glycogen, whereas the way in which the diets were administered resulted in increased levels of these substrates in the animals in the RAP and RAD groups. Additionally, the

Table 2 Adipose tissue weight both *ad libitum* commercial and AIN-93 groups and their respective feed restricted groups

	ALP	RAP	ALD	RAD
SUB	1.6 ± 0.8	1.1 ± 0.4	2.2 ± 0.4 ‡	1.0 ± 0.4
MESE	2.6 ± 1.4	1.1 ± 0.7 *	2.8 ± 1.0	1.7 ± 0.7 *
RETRO	3.0 ± 2.0	1.3 ± 1.0 *	3.5 ± 1.4	1.6 ± 0.7 *

ALP *Ad libitum* commercial (Purina®) diet group, RAP Restricted commercial (Purina®) diet group, ALD *Ad libitum* semi-purified AIN-93 diet group, RAD Restricted semi-purified AIN-93 diet group, SUB from subcutaneous tissue(g), MESE mesenteric tissue (g), RETRO retroperitoneal tissues (g); ‡ Significant difference compared to all groups * Significant difference compared to the ALP group (p < 0.05); *significant difference compared to the ALD group (p < 0.05)

American Institute of Nutrition diet (AIN-93 M) that was administered *ad libitum* improved the aerobic and anaerobic capacity of the ALD group, probably due to the lower density of these animals in water.

Malnutrition in animals is often characterised by low serum albumin and total protein concentrations and high levels of liver lipids [18,25]. In the present study, the animals that had restricted access to feed (RAP and RAD) did not show these characteristics, confirming previous research [4]. In addition, studies have shown that dietary restriction (80 to 60% of *ad libitum* intake) decreases the risk of chronic degenerative diseases such as cancer, type-2 diabetes and kidney disease, prolonging the life span of laboratory rats and mice by up to 40% without causing malnutrition [5-7].

Comparing the effects of a standard diet (Purina®) to those of a freely administered high calorie diet, Chun, Lee, Kim, et al. [26] showed that animals on a high calorie diet have higher levels of body fat. These findings are consistent with the present study, where the ALD group, which was fed a higher caloric diet American Institute of Nutrition diet (AIN-93 M), showed more weight gain than the ALP group. According to Silva, Marcondes and Mello [27], animals that are subjected to

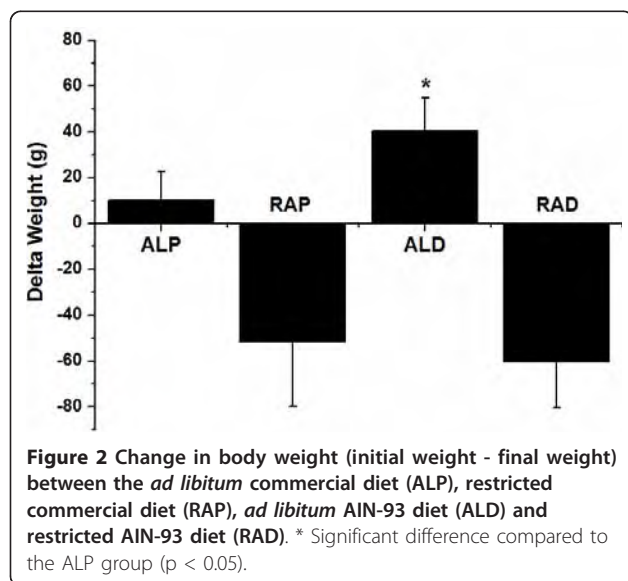


Table 3 Values of the levels of liver glycogen and soleus (GLYC_{SOL}; mg/100 mg) and gastrocnemius muscles, and the levels of triglyceride from this tissues

	ALP	RAP	ALD	RAD
GLYC _{SOL}	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1 *	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1 *
GLYC _{GAS}	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.1 *	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
GLYC _{LIV}	0.9 ± 0.2	3.9° ± 1 *	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.5 *
TG _{SOL}	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2
TG _{GAS}	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2

ALP *Ad libitum* commercial (Purina®) diet group, RAP Restricted commercial (Purina®) diet group, ALD *Ad libitum* semi-purified AIN-93 diet group, RAD Restricted semi-purified AIN-93 diet group, GLYC_{LIV} glycogen content of liver (mg/100 mg), GLYC_{GAS} glycogen content of gastrocnemius (mg/100 mg), GLYC_{SOL} glycogen content of soleus (mg/100 mg), TG_{SOL} triglyceride content of soleus (mg/100 mg), TG_{GAS} triglyceride content of gastrocnemius (mg/100 mg) * Significant difference compared to the ALP group (p < 0.05); *significant differences compared to the ALD group (p < 0.05)

Table 4 Aerobic and anaerobic capacity and the concentration of lactate corresponding to aerobic capacity

	ALP	RAP	ALD	RAD
AT (%PC)	4.4 ± 0.4	4.8 ± 0.9	4.7 ± 0.3	4.3 ± 0.3
[Lac] _{AT} (mM)	6.6 ± 1.1	7 ± 0.7	5.2 ± 1 ‡	6.7 ± 0.9
Tlim (s)	63.4 ± 18.2	72.10 ± 47	116.5 ± 26.3†	94.1 ± 50

ALP *Ad libitum* commercial (Purina®) diet group, RAP Restricted commercial (Purina®) diet group, ALD *Ad libitum* semi-purified AIN-93 diet group, RAD Restricted semi-purified AIN-93 diet group, AT aerobic capacity, Tlim anaerobic capacity, [Lac]_{AT} lactate concentration corresponding to aerobic capacity; † Significant difference compared to the ALP and RAP groups (p < 0.05); ‡ Significant difference compared to all groups (p < 0.05)

high-fat diets tend to accumulate more fat than control animals.

The RAP and RAD groups showed higher glycogen values, primarily in the soleus muscle and liver, than those fed *ad libitum*. Corroborating these findings, Pedrosa, Tirapegui, Rogero, et al. [28], when comparing sedentary and trained animals, both with and without feed restriction (25 and 50% of *ad libitum* intake), observed higher muscle and liver glycogen values in the animals in the restricted groups. In addition, Wetter, Gazdag, Dean, et al. [29] observed similar or higher muscle glycogen values in rats subjected to feed restriction (60% of consumed by the *ad libitum* group), as has been demonstrated by other studies [30,31]. Conversely, these authors found higher liver glycogen values in animals fed *ad libitum*, suggesting that the influence of dietary restriction on the content of this substrate is dependent on the tissue analysed. In this regard, further studies are needed to determine the changes caused by dietary restriction on the mechanisms of glycogen synthesis and utilisation in different tissues.

The differences in the levels of muscular glycogen could influence aerobic and anaerobic capacity in animals, as determined using the lactate minimum test. However, there were no significant differences in the anaerobic threshold values between the groups, demonstrating that the diets and their form of administration did not influence the aerobic capacity of the animals. In addition, the loads corresponding to the anaerobic threshold in relation to body weight (4.5%) are similar to those reported by previous studies that used eutrophic rats [18,32,33] ARAÚJO et al., 2007).

However, the animals in the ALD group showed lower lactate concentrations values. This finding, together with the lower quantities of glycogen in the *ad libitum* groups, is consistent with those reported by Voltarelli, Gobatto and Mello [33], who observed lower lactate concentrations values in glycogen-depleted animals when comparing anaerobic threshold determined using lactate minimum test in a group of fed animals and a group of animals subjected to glycogen depletion.

The animals in the ALD group showed the same characteristics observed in humans subjects during a lactate minimum test after glycogen depletion, i.e., the intensity corresponding to the minimum lactate concentration was not influenced by a reduction in glycogen stores; however, the lactate concentrations were significantly lower upon depletion [20]. Further, the lactate concentrations and time to exhaustion values may have been influenced by the density of the animals in the ALD group, since these animals had an increase in body weight and body fat.

Araújo, Araújo, Dangelo, et al. [34] demonstrated that the anaerobic threshold in obese animals, as determined using maximal steady state lactate levels, may be higher than that in well-nourished animals, attributing these findings to the lower density of these animals in an aquatic environment. Thus, in our study, the intensity at the same workload may have been underestimated for animals that have higher levels of fat [35], resulting in the lower lactate concentrations values and higher time to exhaustion values seen in the ALD group. Therefore, more studies are needed to normalise the variables related to the increased loads used in lactate minimum test as a function of the body density of the animals.

The results of this study suggest that the caloric differences between the two diets did not noticeably influence the levels of muscle and liver glycogen, whereas these levels could be influenced by the form in which the diets were administered. However, the higher levels of glycogen seen in the RAP and RAD groups did not influence the aerobic and anaerobic capacity as determined using the lactate minimum test. In addition, the lower lactate concentrations and higher time to exhaustion values seen for the ALD group may be explained by the lower density of the animals in this group. Thus, one limitation of this study was the lack of quantification of the density of the animals and the use of loads that did not consider this variable in water.

In summary, feed restriction induced changes in energetic substrates, and *ad libitum* intake of a semi-purified American Institute of Nutrition diet (AIN-93 M) resulted in increased adipose tissue, which likely reduced the density of the animals in water and favoured their performance in the swimming exercise.

Conclusion

From the results of this study, we can conclude that: 1) the animals in the diet-restricted groups showed no manifestations of malnutrition, indicating that the amount of feed offered (60% of that consumed by the *ad libitum* group) was sufficient; 2) the caloric differences in the diets studied did not alter the levels of muscle and liver glycogen, whereas the form of administration (*ad libitum* or restricted) did modify the

quantities of these substrates; 3) the differences in the levels of glycogen between the two groups had little influence on the aerobic and anaerobic capacity of the animals; and 4) the ALD group animals may have had a lower density in water, which might have influenced the lactate concentrations and time to exhaustion values observed in this group.

Abbreviations

AT: Anaerobic Threshold; Tlim: Time to Exhaustion; LM: Lactate Minimum Test; ALP: *Ad libitum* commercial (Purina®) diet group; RAP: Restricted commercial (Purina®) diet group; AIN-93: Diet proposed by the American Institute of Nutrition in 1993; ALD: *Ad libitum* semi-purified AIN-93 diet group; RAD: Restricted semi-purified AIN-93 diet group; GH: Growth hormone; [LAC]: Lactate concentrations; [LAC]_{AT}: Lactate concentrations at Anaerobic Threshold intensity; WC: Weight change; ALB: Concentrations of albumin; PRO_{TOTAL}: Total protein; LIP_{LIV}: Lipid content in the liver; GLYC_{LIV}: Glycogen content in the liver; GLYC_{SOL}: Soleus muscle glycogen content; TG_{SOL}: Triglycerides content in the soleus muscle; TG_{GAS}: Triglycerides content in the gastrocnemius muscle.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technicians at the Biodynamic Laboratory of the Physical Education Department at UNESP Campus Rio Claro for their indispensable support, Clarice Sibuya and José Roberto Rodrigues, and the National Council of Scientific and Technological Development - CNPq, the Foundation for Research Support of São Paulo - FAPESP for the financial support and FUNDUNESP. We also thank Corn Products Brasil® for the donation of the dietary materials used in this experiment.

Author details

¹Laboratory of Nutrition, Metabolism and Exercise, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 24^a avenue n° 1515, P.O. Box 199, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brazil. ²Laboratory of Exercise Physiology (LAFE), Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Roberto Simonsen Street, 305, Presidente Prudente, SP, Brazil. ³Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24^a n° 1515, P.O. Box 199 Bela Vista, Rio Claro 13506-900, SP, Brazil.

Authors' contributions

All authors were responsible for the experimental design, data collection, statistical analysis and preparation of the manuscript. All authors worked read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 September 2011 Accepted: 26 March 2012

Published: 26 March 2012

References

- Yu BP, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, Lynd FT: **Life Span Study of SPF Fischer 344 Male Rats Fed AdLibitum or Restricted Diets: Longevity, Growth, Lean Body Mass and Disease.** *J Gerontol* 1982, **2**:130-141.
- Oscari LB, Holloszy JO: **Effects of weight changes produced by exercise, food restriction, or overeating on body composition.** *J Clin Invest* 1969, **48**:2124-2128.
- Holloszy JO: **Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation.** *J Gerontol* 1993, **48**:97-100.
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D: **The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake.** *J Nutr* 1986, **116**:641-654.
- Weindruch R: **The retardation of aging by caloric restriction: Studies in rodents and primates.** *Toxicol Pathol* 1996, **24**:742-745.
- Mattson MP, Wan R: **Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems.** *J Nutr Biochem* 2005, **16**:129-137.
- Heilbronn LK, Ravussin E: **Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans.** *Am J Clin Nutr* 2003, **78**:361-369.
- Shetty PS: **Physiological mechanisms in the adaptive response of metabolic rates to energy restriction.** *Nutr Res Rev* 1990, **3**:49-74.
- Walberg JL: **Aerobic exercise and resistance weight training during weight reduction. Implications for obese persons and athletes.** *Sports Med* 1989, **7**:343-356.
- Vanitallie TB, Yang M: **Cardiac dysfunction in obese dieters: a potentially lethal complication of rapid, massive weight loss.** *Am J Clin Nutr* 1984, **39**:695-702.
- Martin B, Ji S, Stuart MS, Mattson MP: **"Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters.** *PNAS* 2010, **107**:6127-33, (Early Edition).
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nutr* 1993, **11**:1939-1951.
- Knoepfli-lenzin C, Boutellier U: **Lactate Minimum is Valid to Estimate Maximal Lactate Steady State in Moderately and Highly Trained Subjects.** *J Strength Condit Res* 2011, **5**:1355-1359.
- Dotan R, Zigel L, Rotstein A, Greenberg T, Benyamini Y, Falk B: **Reliability and validity of the lactate-minimum test. A revisit.** *J Sports Med Phys Fitness* 2011, **1**:42-49.
- Pardono E, Madrid B, Motta DF, Mota MR, Campbell CSG, Simões HG: **Lactato mínimo em protocolo de rampa e sua validade em estimar o máximo estado estável de lactato.** *Rev Bras Cineantropometria Desempenho Hum* 2009, **2**:174-180.
- Souza TNT, Yamaguti SAL, Campbell CSG, Simões HG: **Identificação do lactato mínimo e glicose mínima em indivíduos fisicamente ativos.** *R Bras Ci e Mov Brasília* 2003, **2**:71-75.
- Oliveira CA, Paiva MF, Mota CA, Ribeiro C, Leme JA, Luciano E, Mello MA: **Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats.** *Islets* 2010, **4**:240-246.
- Voltairelli FA, Gobatto CA, Mello MAR: **Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos durante o exercício de natação.** *R da Educação Física* 2007, **1**:33-39.
- Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubon E: **Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise.** *Comp Biochem Physiol* 2001, **130**:21-27.
- Tegtbur U, Busse MW, Braumann KM: **Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise.** *Med Sci Sports Exerc* 1993, **5**:620-627.
- de Araujo GG, Papoti M, de Machado FB, de Mello MA, Gobatto CA: **Protocols for hyperlactacidemia induction in lactate minimum test adapted to swimming rats.** *Comp Biochem Physiol* 2007, **4**:888-892.
- Engels RC, Jones JB: **Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate. L-lactate and other metabolites.** *Anal Biochem* 1978, **88**:475-484.
- Nogueira DM, et al: **Sangue-parte I: Glicídios.** In *Métodos de bioquímica clínica*. Edited by: Nogueira DM, et al. São Paulo: Pancast; 1990:153-168.
- Lo S, Rousseau JC, Taylor AW: **Determination of glycogen in small tissue samples.** *J Appl Physiol* 1970, **2**:234-236.
- Almeida PBL, Mello MAR: **Desnutrição protéica fetal/neonatal, ação da insulina e homeostase glicêmica na vida adulta: efeitos do jejum e do exercício agudo.** *Rev Bras Educação Física* 2004, **1**:17-30.
- Chun MR, Lee YJ, Kim KH, Kim YW, Park SY, Lee KM, Kim JY, Park YK: **Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on muscle insulin resistance in rats.** *J Korean Med Sci* 2010, **7**:1053-1059.
- Silva MPD, Marcondes MCGG, Mello MAR: **Exercício aeróbio e anaeróbio: Efeitos sobre a gordura sérica e tecidual de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.** *Rev Bras Atividade Física e Saúde* 1999, **3**:43-56.
- Pedrosa RG, Tiraepgui J, Rogero MM, Castro IA, Pires ISO, Oliveira AAM: **Influência do exercício físico na composição química da massa corporal magra de ratos submetidos à restrição alimentar.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004, **1**:27-34.

29. Wetter TJ, Gazdag AC, Dean DJ, Cartee GD: **Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats.** *Am J Physiol* 1999, **276**:728-738.
30. Gupta G, She L, Ma XH, Yang XM, Hu M, Cases JA, Vuguin P, Rossetti L, Barzilai N: **Aging does not contribute to the decline in insulin action on storage of muscle glycogen in rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **278**:111-117.
31. Montori-Grau M, Minor R, Lerin C, Allard J, Garcia-Martinez C, de Cabo R, Gómez-Foix AM: **Effects of aging and calorie restriction on rat skeletal muscle glycogen synthase and glycogen phosphorylase.** *Exp Gerontol* 2009, **6-7**:426-433.
32. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR: **Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test.** *Braz J Med Biol Res* 2002, **35**:1389-1394.
33. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR: **Glicogênio muscular e limiar anaeróbico determinado em ratos durante a natação.** *Motriz* 2004, **1**:25-30.
34. de Araujo GG, Araujo MB, Dangelo RA, Machado FB, Mota CSA, Ribeiro C, Mello MAR: **Máxima Fase Estável de Lactato em Ratos Obesos de Ambos os Gêneros.** *Rev Bras Med Esporte* 2009, **1**:46-49.
35. Voltarelli FA, Nunes WMS, Santiago V, Pauli JR, Garcia DR, Romero C, Silva AS, Mello MAR: **Determinação do Limiar Anaeróbico em Ratas Obesas com Glutamato Monossódico (MSG).** *Revista Logos* 2003, **11**:84-93.

doi:10.1186/1550-2783-9-10

Cite this article as: de Moura et al.: Feed restriction and a diet's caloric value: The influence on the aerobic and anaerobic capacity of rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2012 **9**:10.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.8 Artigo 8: Por fim, foi possível observar no presente projeto de pesquisa que animais alimentados com dieta controle (AIN-93M) se diferenciaram de maneira modesta ou insignificante de ratos alimentados com dieta rica em gordura em vários parâmetros. Visto que foram encontradas diferenças entre dietas controles (AIN-93M e Ração comercial Purina®) em decorrência do desequilíbrio na concentração de carboidratos resultando nos mais diversos e diferentes efeitos, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações decorrentes da administração de duas dietas tidas como controle frente a uma dieta rica em lípides.

Em fase de submissão: Moura LP et al. Alterações hepáticas decorrentes da administração de duas dietas consideradas controles comparadas a uma dieta hiperlipídica/hipercalórica.

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DE DUAS DIETAS CONSIDERADAS CONTROLES COMPARADAS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA/HIPERCALÓRICA

Leandro Pereira de Moura¹, Amanda Christine da Silva Sponton¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, José Rodrigo Pauli² e Maria Alice Rostom de Mello¹.

1: Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista – UNESP / Rio Claro/SP.

2: Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP / Limeira/SP.

Autor responsável pelas correspondências:

Leandro Pereira de Moura

Endereço: Departamento de Educação Física. Avenida 24 A, 1515.

Bairro: Bela Vista CEP: 13506-900 – Rio Claro, SP. Brasil.

Telefone: (19) 3526-4308 – Fax: (19) 35264321

E-mail: leandropereiram@hotmail.com

Apoio financeiro: FAPESP, FUNDUNESP, CAPES e CNPq

RESUMO

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS DE DUAS DIETAS CONSIDERADAS CONTROLES COMPARADAS À UMA HIPERLIPÍDICA/HIPERCALÓRICA

O elevado consumo de calorias e/ou de lipídeos contribui para o desenvolvimento de obesidade e depósito de gordura no fígado. O acúmulo de gordura hepático pode gerar efeitos deletérios ao órgão, podendo levar desde complicações até à falência. Com o intuito de alimentar animais controles, vários estudos utilizam diferentes dietas tidas como balanceadas. As principais dietas utilizadas para manutenção desses animais é a desenvolvida pelo Instituto Americano de Nutrição em 1993 (AIN-93) ou a ração comercial para roedores Purina[®]. Devido a diferenças calóricas entre essas duas dietas, resultados podem ser sub ou supra estimados nas diversas áreas de pesquisas nas quais as variáveis calorias e nutrientes vem sendo amplamente estudadas. Visto isso, o presente estudo objetivou analisar os efeitos fisiológicos a nível hepático da administração de duas dietas não isocalóricas, mas consideradas controles (padrões), em relação a uma dieta hiperlipídica/hipercalórica em ratos. Para isso, trinta ratos Wistar adultos (90 dias de idade) foram divididos em três grupos durante oito semanas, Grupo 1, Purina (P): ratos alimentados com ração comercial para roedores (3.028Kcal/Kg); Grupo 2, AIN-93M (AIN): ratos alimentados com ração considerada como tipo controle pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M: 3.803 Kcal/Kg) e grupo 3, Hiperlipídica/hipercalórica (Hiper): ratos alimentados com dieta rica em gordura (5.350Kcal/Kg). A ingestão alimentar foi registrada semanalmente e ao final do experimento o peso corporal, índice de Lee (parâmetro de obesidade para ratos), eficiência energética das dietas, consumo energético (Kcal), concentrações séricas de insulina, HDL e ácidos graxos livres e acúmulo de gordura no fígado foram analisados. A ingestão alimentar foi menor no grupo Hiper em relação aos grupos AIN e P. Ao final do experimento, o peso corporal, índice de Lee, eficiência e consumo energético das dietas, HDL e insulinemia apresentaram-se elevados para o grupo Hiper em relação ao grupo P. Os animais do grupo AIN não apresentaram diferenças em relação ao grupo P, nem em relação ao grupo Hiper para os parâmetros supracitados. Quanto à concentração de AGL sérico, o grupo Hiper apresentou maior concentração em relação aos demais grupos. Quanto ao acúmulo de gordura hepática, os animais dos grupos AIN e Hiper apresentaram maior acúmulo de gordura neste órgão em relação ao grupo P e ambos não apresentaram diferenças entre si. Considerando os resultados obtidos, apesar de em vários resultados a diferença calórica entre as duas dietas balanceadas não ter desencadeado diferenças fisiológicas significativas, o principal achado deste estudo foi que a dieta AIN-93M não se diferenciou da hiperlipídica/hipercalórica em nenhuma análise do experimento exceto para os níveis de AGL séricos, mostrando assim a maior contribuição da dieta AIN no desenvolvimento da obesidade e suas consequências como a DHGNA. Portanto, fica claro que diferentes dietas consideradas balanceadas que são ofertadas a

grupos de animais controles, podem de interferir de diferentes maneiras em parâmetros fisiológicos.

Palavras-chaves: Obesidade, Dietas Controles, Dieta Hiperlipídica/Hipercalórica e Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica.

INTRODUÇÃO

A inatividade física e o aumento da ingesta calórica colaboram fortemente para a instalação da obesidade. Está bem estabelecido que o excesso de gordura corporal na obesidade está relacionada a desordens inflamatórias. Esta relação entre obesidade e diabetes pode ser observada através dos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no plasma como interleucina- β e 6 (IL-beta e IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), tanto em adipócitos de humanos quanto de animais com excesso de gordura corporal.

A causa do processo inflamatório parece ter origem nas células adiposas, porém os mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Recentes achados que demonstraram que a obesidade é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos e células adiposas que compartilham a expressão de múltiplos genes têm provido outra dimensão para o entendimento do desenvolvimento da inflamação relacionada a obesidade. A presença de macrófagos no tecido adiposo auxilia na produção de mediadores inflamatórios em atividade isolada ou em conjunto com os adipócitos. Portanto, estas células do sistema imune (macrófagos) teriam participação fundamental no desenvolvimento de resistência á insulina. Um dos primeiros trabalhos que mostra uma relação direta do aumento da adiposidade e RI foi descrito por Reaven em 1988 e, atualmente, é sabido que tanto a elevação dos níveis séricos de ácidos graxos (Boden & Shulman, 2002) quanto a elevação dos níveis de proteínas pró-inflamatórias, ambos causados pelo excesso de tecido adiposo, modulam proteínas que participam da via de sinalização da insulina comprometendo-a, gerando assim, um quadro de resistência ao hormônio desde tecidos periféricos (Da Silva et al., 2010) até à níveis hipotalâmicos (Moraes et al., 2009). Sendo assim, a obesidade é vista como um problema de saúde publica mundial associada a várias doenças como: doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, resistência à insulina (RI) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Fontaine et al., 2003, Kahn & Utzschneider, 2006; Hupfeld & Olefsky, 2010) entre outras.

A RI é um estado que precede a DM2 encontrado com alta frequência em obesos em decorrência do processo inflamatório, principalmente do tecido adiposo visceral (Franks et al., 2010; Olefsky & Glass 2010). Estado onde a via de sinalização desse hormônio não age perfeitamente, e com isso, tecidos necessitam de um maior aporte de insulina para iniciar e completar toda a cascata de fosforilação (Kahn et al., 2006). Alguns estudos mostram que há

uma relação direta entre RI e DHGNA, onde foi visto que quanto mais resistentes ao hormônio maiores são as chances do acúmulo de gordura no fígado (Moura et al., 2012; Mizokami-Stout, Cree-Green, Nadeau, 2012). Situações de resistência à insulina causadas por imperfeita interação entre hormônio e seu receptor ou onde há a interrupção da transdução de sinais decorrentes da insulina provocam alterações em todos os processos metabólicos proteicos, glicídicos e lipídicos (Liu, Bengmark, Qu, 2010). Este quadro de hiperinsulinemia e desbalanço de perfil lipídico sérico encontrado no estado de RI acarreta o aumento do estoque lipídico hepático e inicia a instalação da DHGNA. O aumento do tecido gorduroso hepático pode gerar desde quadros lipotóxicos ao órgão e/ou até sua falência (Sheth et al., 1997; Mulhall et al., 2002; Angulo 2002;; Lewis & Mohanty, 2010; Tiniakos, Vos and Brunt, 2010).

Com o intuito de alimentar animais controles, vários estudos utilizam diferentes dietas tidas como balanceadas. As principais dietas utilizadas para manutenção desses animais é a desenvolvida pelo Instituto Americano de Nutrição em 1993 (AIN-93) ou a ração comercial para roedores Purina[®]. Devido diferenças calóricas entre essas duas dietas, resultados podem estar sendo sub ou supra estimados nas diversas áreas de pesquisas nas quais as variáveis calorias e nutrientes vem sendo amplamente estudadas. Por isso, o presente estudo objetivou analisar os efeitos fisiológicos a nível hepático da administração de duas dietas não isocalóricas, mas consideradas controles (padrões), em relação a uma dieta hiperlipídica/hipercalórica em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Trinta ratos da linhagem Wistar com 90 dias de idade no início do experimento foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno medindo 37 x 31 x 16 (cinco ratos por gaiola), à temperatura ambiente de 21 ± 1 °C e foto período de 12 horas claro/escuro. Todos os procedimentos adotados com os animais foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética no uso de Animal em Pesquisa (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP, Campus Rio Claro (Processo número: 2011/6274).

Grupos Experimentais

Após serem divididos em três grupos (10/grupo), de acordo com a dieta administrada, os animais permaneceram sob observação durante 8 semanas (dos 90 aos 150 dias de idade): Grupo 1, Purina (P): ratos alimentados com ração comercial para roedores (Labina Purina[®]); Grupo 2, AIN-93M (AIN): ratos alimentados com ração considerada balanceada pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M) e grupo 3, Hiperlipídica/hipercalórica (Hiper): ratos alimentados com dieta rica em gordura.

Composição das Dietas

Tabela 1. Composição dietética dos grupos 1 (Purina), 2 (AIN) e 3 (Hiper) e seus respectivos valores calóricos.

	Carboidratos (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Kcal/Kg
Purina	43,7	23	4	3.028
AIN-93M	72,1	14	4	3.802
Hiperlipídica	40,8	14	35*	5.350

*: 35% sendo 4% de gordura óleo de soja e 31% de gordura animal.

A composição detalhada das misturas de sais minerais e de vitaminas empregada na confecção das dietas AIN e Hiper acha-se descrita em Reeves et al., (1993).

Avaliação geral

Durante todo período experimental a ingestão alimentar e energética (Kcal) foram registradas semanalmente. Ao final do experimento, os animais foram pesados e medidos para determinação do índice de Lee (razão da raiz cúbica do peso corporal (em gramas) sobre o comprimento naso-anal (em centímetros) multiplicado por 1000), eficiência alimentar (ganho de peso/consumo médio de ração) e após isso todos os animais foram eutanasiados por decapitação após anestesia com CO₂ e amostras de sangue foram coletadas para as dosagens de HDL e insulina por kit comerciais (Laborlab®) e AGL através do método de coloração descrito por Regow et al., (1971). Alíquotas hepáticas foram extraídas para avaliação do acúmulo de gordura no órgão sob forma de triglicerídeos.

Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente através ANOVA *one-way* e quando necessário, o teste de post-hoc Bonferroni foi utilizado, com nível de significância pré-estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Os animais submetidos à oferta de dieta hiperlipídica apesar de apresentarem menor consumo alimentar (Figura 1A), apresentaram maior ganho de peso (Figura 1B), índice de Lee (Figura 1C), eficiência alimentar (Figura 1D), consumo energético (Figura 1E), concentrações de HDL (Figura 1F) e insulina (Figura 1G) em relação ao grupo P, não sendo diferente do grupo do AIN.

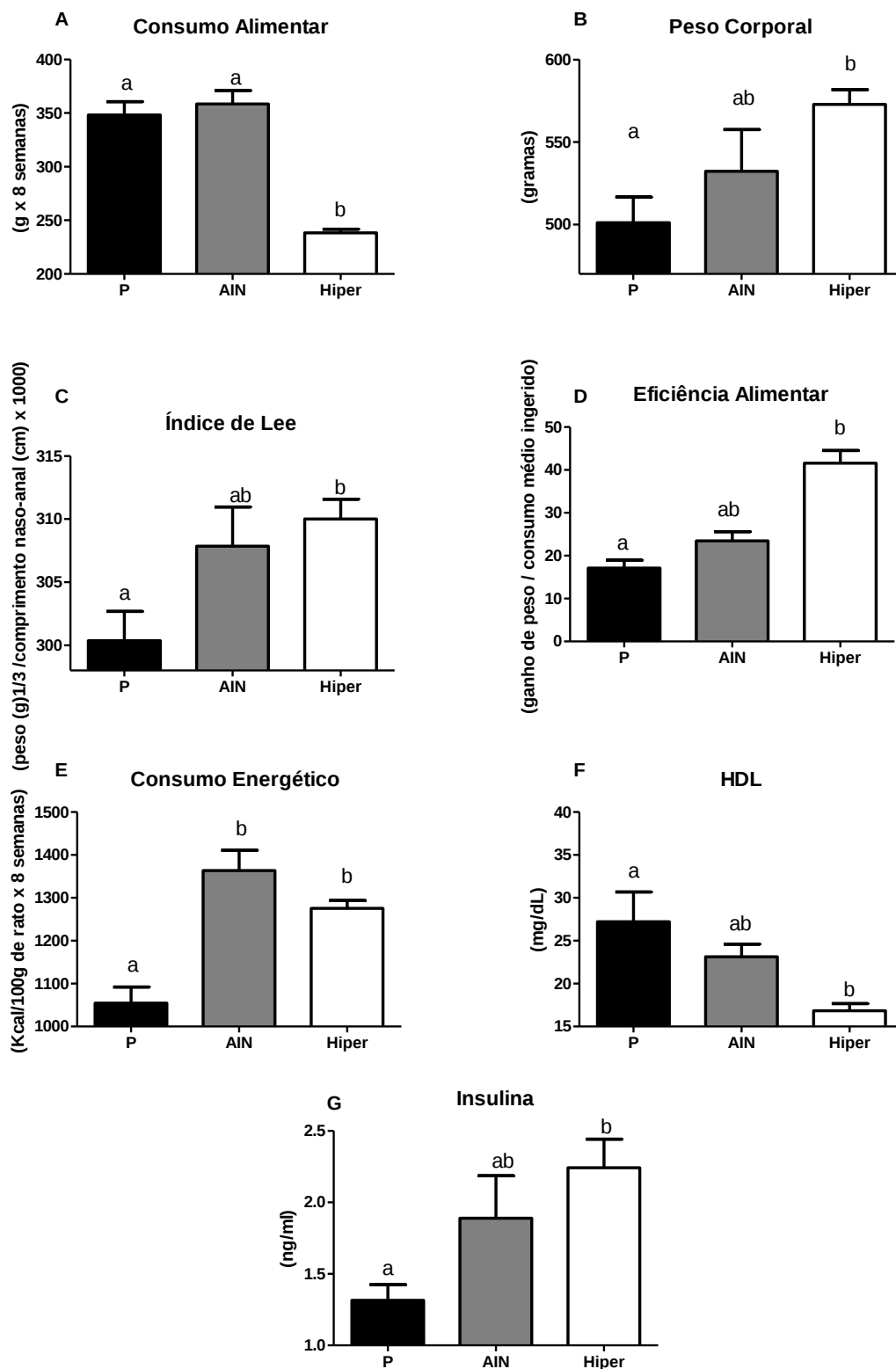


Figura1. A: Consumo alimentar em gramas ao longo de 8 semanas, B: Peso corporal e C: índice de Lee ao final do período experimental, D: Eficiência alimentar (ganho de peso/consumo médio de ração ingerido) e E: Consumo energético ao longo de 8 semanas e F: HDL-colesterol e G: insulina após o período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Anova one-way: a $\neq$ b, ab=a e b

Quando os ácidos graxos livres (AGL) foram analisados, foi visto que a dieta rica em lípides fez com essa porção sérica de gordura estivesse elevada em relação aos demais grupos (Figura 8).

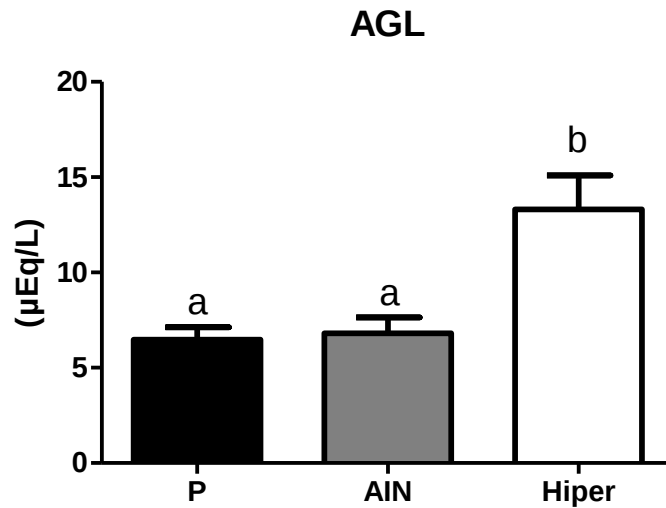


Figura 8. Concentração de ácidos graxos livres ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Anova one-way: $a \neq b$.

Os valores calóricos superiores tanto da dieta AIN como da dieta hiperlipídica fizeram com que o acúmulo de gordura no fígado desses grupos não se diferenciasse entre si, mas sendo maior em relação ao grupo P (Figura 9).

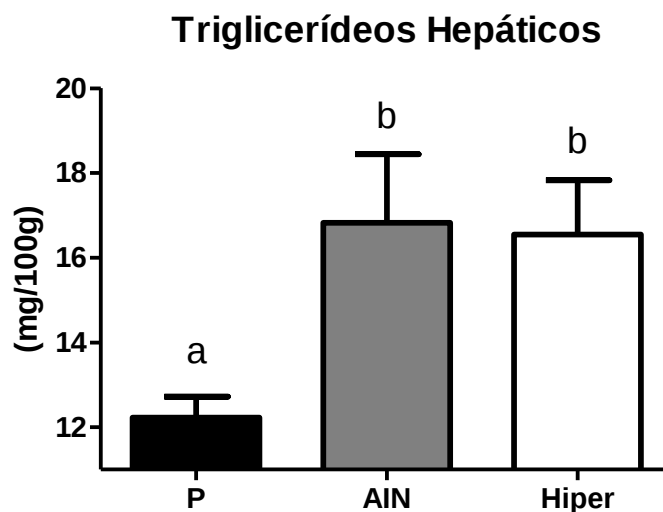


Figura 9. Concentração de triglicerídeos hepáticos ao final do período experimental. Resultados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Anova one-way: $a \neq b$.

DISCUSSÃO

Visto que a obesidade é um problema de saúde pública mundial e que vem crescendo de forma acelerada, trazendo consigo inúmeros efeitos colaterais (Heber, 2010), pesquisas relacionadas à essa área de conhecimento tornam-se de suma importância para maior entendimento de prevenções e/ou tratamento dessa doença. No desenvolvimento de pesquisas acerca do ganho de massa adiposa corporal, dietas com diferentes valores calóricos são tidas como controle e, portanto são comumente usadas no meio científico. Uma vez que estas dietas tidas como balanceadas apresentam diferenças calóricas entre elas, estudos científicos podem estar sendo sub ou supra estimados. Visto isso, o presente estudo visou além de comparar ambas as dietas tidas como balanceadas, objetivou também compará-las com uma dieta rica em lípidos no desenvolvimento da obesidade e seus transtornos como a DHGNA.

Tanto o consumo de gordura bem como o consumo de carboidratos tem aumentado em todo o mundo (Alemany, 2011), o alto consumo e menor gasto energético desses macronutrientes agem como produtos chaves no processo de lipogênese e que cronicamente induz à obesidade (Duca, Swartz, Sakar and Covassa, 2012). No presente estudo, a dieta rica em lípidos foi mais eficiente energeticamente, esses animais apresentaram relação indireta entre o consumo de gordura com ganho de peso, pois mesmo com menor consumo deste nutriente houve maior ganho de peso corporal para este grupo. Tratando de consumo energético (Kcal) mesmo os grupos AIN e Hiper não se diferenciando entre si e consumindo menor quantidade (g) de dieta, esses animais consumiram maior quantidade de energia em relação ao P. A grande oferta de calorias faz com que níveis de ácidos graxos livres aumentem. Os receptores de membrana *Toll Like Receptor* (TLR), possuem forte afinidade por este tipo de gordura e quando ativados iniciam o processo inflamatório e apoptótico ativando proteínas como JNK, IKK, iNOS e Caspases 8 e 3 que por sua vez pode aumentar a ingesta energética por interferir no controle da fome, diminuindo a sensação de saciedade, mais especificamente em neurônios do sistema POMC do núcleo arqueado e região hipotalâmica lateral (Moraes et al., 2009; Milanski et al., 2009). Portanto, no presente estudo foi possível ver que quanto mais calórica a dieta mais eficiente em converter alimento ingerido em peso corporal, a alta disponibilidade de energia pode contribuir para o aumento de ingestão energética e que perante duas dietas tidas como balanceadas há uma maior resposta da AIN em relação ao pélete para o ganho de peso, podendo assim desencadear obesidade e suas complicações.

São várias as complicações oriundas da obesidade, uma delas é a dislipidemia em que é caracterizada pela alta concentração de triacilgliceróis e baixos níveis de HDL (Rader, 2007). O HDL tem importante função de fazer o transporte reverso do colesterol e seus baixos níveis séricos estão inversamente relacionados com doenças cardiovasculares ateroscleróticas

(Walldius et al., 2001; Annema & Tietge, 2012). No presente estudo foi mostrado que animais alimentados com dieta hipercalórica e rica em gordura apresentaram menores valores nas concentrações de HDL frente aos demais grupos e que a dieta AIN, considerada controle, não se diferenciou nem da dieta P bem como da dieta rica em lípides. A dieta AIN por possuir maior concentração de carboidratos, possui maior valor calórico em relação a P. De acordo com Boer (2012), o elevado consumo de açúcares (CHO) na alimentação pode levar ao desequilíbrio no processo anti e pró-inflamatório e diminuição do HDL (Du et al., 2008). O controle da ingestão de CHO é de suma importância para a qualidade de vida, de acordo com Müller *et al.* 2011, somente com a diminuição da ingestão de CHO para pacientes DM2 é capaz de promover efeitos benéficos na homeostase glicêmica e com isso levar à diminuição de medicação para estes pacientes.

Indivíduos portadores de pré-DM2 apresentam quadros de resistência à insulina, onde maiores concentrações desse hormônio são necessárias para que ocorra a inteira transdução de sinal intracelular e conseqüentemente a entrada da molécula de glicose à célula (Tabák et al., 2012). Neste estudo, o comportamento da secreção de insulina foi paralelo a quantidade de energia proveniente de cada dieta, ou seja, quanto mais calórica a dieta maior concentração de insulina sérica.

A dieta AIN não apresentou diferença com a dieta P nos diversos parâmetros avaliados. Contudo, o preocupante é o fato dessa dieta (AIN) não ter apresentado diferença também com a hiperlipídica, mostrando assim, que a diferença calórica entre as duas dietas tidas como balanceadas fez com que a AIN não se diferenciasse da hiperlipídica. A maior oferta de energia proveniente das dietas AIN e Hiper além de provocar desequilíbrio entre as frações de colesterol, faz com que aumente a disponibilidade de ácidos graxos livres (AGL) circulantes. Os AGL possuem afinidade pelo receptores do tipo TLR (Toll-like receptor) e devido ao seu aumento esses receptores passam a ser fosforilados ativando o sistema de defesa e com isso levando ao aumento de proteínas pró-inflamatórias que contribuem fortemente para diminuição da resposta da via de sinalização ao hormônio fazendo com que assim ambientes de hiperinsulinemia sejam instalados no organismo (Shi et al., 2006).

A insulina é um hormônio anabólico, que participa diretamente da atividade lipogênica em diferentes tecidos, fazendo o transporte do α -glicerolfosfato derivado da quebra da glicose para o meio intracelular e este produto, após se infiltrar na célula, exerce a base para a formação dos triacilgliceróis. Este processo de lipogênese quando é desencadeado a nível hepático pode levar a DHGNA (Schwarz 2003). A DHGNA é uma doença que tem crescido junto com os números de casos de obesidade e DM2 de forma alarmante em todo o mundo (Bonora & Targher 2012). A gordura acumulada no tecido hepático gera quadro de lipotoxicidade e com

isso pode levar o órgão desde pequeno processo inflamatório até à sua falência. Neste experimento, independente da base das dietas, foi possível perceber a alta oferta de energia colabora para o acúmulo de gordura hepática, uma vez que tanto a dieta rica em lípides bem como a dieta com maior concentração de CHO (AIN) conduziram à mesma quantidade de gordura hepática armazenada. Esses achados vão de encontro com estudo de Yang et al., (2012) onde os autores mostram que dietas hipercalóricas à base de gordura ou carboidratos aceleram o desenvolvimento de riscos cardio-metabólicos por contribuírem para o processo inflamatório, debilitarem a via de sinalização de insulina e promoverem ambiente favorável à lipogênese. Visto isso, fica claro que quanto maior a energia ofertada na dieta maior é chance de se desenvolverem alterações metabólicas e uma vez que dietas não iso-energéticas são tidas como balanceadas, maior atenção deve ser dada a utilização dessas dietas.

CONCLUSÃO

De acordo com nossos achados, maior atenção deve ser dada à escolha de dietas balanceadas, sendo que resultados podem ser sub ou supra estimados devido a diferença calóricas encontradas nessas dietas.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores foram responsáveis pelo desenho experimental, coleta de dados, análises estatística e preparação do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram a versão final.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o indispensável apoio dos técnicos do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP Campus Rio Claro: Clarice Sibuya, José Roberto Rodrigues e Eduardo Custódio e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e Fundação para o Desenvolvimento da UNESP - FUNDUNESP pelo suporte financeiro. Agradecem também a Corn Products Brasil® pela doação de materiais para produção das dietas usadas no presente experimento.

REFERÊNCIAS

- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219–246.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289: 187 -- 193.
- Kahn, S.E., Hull, R.L. & Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846 (2006).
- Hupfeld, C.J., Courtney, H. & Olefsky, J.M. in *Endocrinology* 6th edn, Vol. 1 (eds. Jameson, J.L. & De Groot, L.J.) Ch. 41 (Saunders, 2010).
- Osborn O & Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3):363-74.
- Sheth SG, Fredric D, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Inter Med* 1997; 137: 45.
- Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1136-43.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-31.
- REGOW, B.J.M.; CORNELISSEN, P.J.H.C.; HELDER, A.P.; SPIJKERS, J.B.F.; WEBER, Y.M.M. Specific determination of free fatty acid in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 31:187-195, 1971.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, et al. (2009) High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. *PLoS ONE* 4(4): e5045. doi:10.1371/journal.pone.0005045.
- Da Silva AS, Pauli JR, Ropelle ER, Oliveira AG, Cintra DE, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*: December 2010 - Volume 42 - Issue 12 - pp 2180-2188
- BODEN, G.; SHULMAN, G.I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, Greece, v. 32, n. 3, p. 14–23, 2002.
- Mizokami-Stout K, Cree-Green M, Nadeau KJ. Insulin resistance in type 2 diabetic youth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012 Jun 21. [Epub ahead of print]
- Moura et al.: Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. *Lipids in Health and Disease* 2012 11:2.
- Rader DJ. Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* 2007; 120: S12–8.
- Annema, W and Tietge, UJF. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutrition & Metabolism* 2012, 9:25.
- Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E: High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001, 358:2026-2033.
- Heber D: An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr* 2010, 91:280S-283S

- Du H, van der AD, van Bakel MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, van Greevenbroek MM, Jansen EH, Nijpels G, Stehouwer CD, Dekker JM, Feskens EJ: Glycemic index and glycemic load in relation to food and nutrient intake and metabolic risk factors in a Dutch population. *Am J Clin Nutr* 2008, 87:655-661
- Boer MMB, Wetten MLV and Pruijboom L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. *Nutrition & Metabolism* 2012, 9:32
- Du H, van der AD, van Bakel MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, van Greevenbroek MM, Jansen EH, Nijpels G, Stehouwer CD, Dekker JM, Feskens EJ: Glycemic index and glycemic load in relation to food and nutrient intake and metabolic risk factors in a Dutch population. *Am J Clin Nutr* 2008, 87:655-661
- Müller et al. *Nutrition & Metabolism* 2011 8:92 doi:10.1186/1743-7075-8-92
- Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012 Jun 16;379(9833):2279-90.
- Mazzone, T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The Lancet*, Volume 371, Issue 9626, Pages 1800 - 1809, 24 May 2008.
- Yang Zhi-Hong, Miyahara H, Takeo J and Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012, 4:32
- Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K: Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 2003, 77:43-50.
- Enzo Bonora & Giovanni Targher. Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9, 372-381
- Alemany M. **Utilization of dietary glucose in the metabolic syndrome.** *Nutrition & Metabolism* 2011, 8:74
- Duca FA, Swartz TD, Sakar Y and Covasa M. Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors. *International Journal of Obesity* , (1 May 2012) | doi:10.1038/ijo.2012.45
- Milanski M, et. al. *J Neurosci*. 29: 359-70, 2009.
- H Shi, MV Kokoeva, K Inouye, I Tzamelis, H Yin, JS Flier. **TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.** *J Clin Invest*, 116 (2006), pp. 3015–3025
- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 560–578

- Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 145–171.
- Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med* 2010; **362**: 485–493
- Kahn SE, Hull RL and Utzschneider KM. **Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.** *Nature* **444**, 840-846 ,2006.
-

4.9 Resultados referentes aos grupos alimentados com dieta rica em gordura ao final do experimento

Ao final do período experimental (160 dias de idade) todos os animais foram sacrificados e foi visto que a administração da dieta hiperlipídica associada ou não com o destreinamento leva os animais a uma maior intolerância à glicose (GTT) e resistência à insulina (QUICK, HOMA e Teste de Tolerância à Insulina) e o exercício físico consegue minimizar esses efeitos mesmo associado ao consumo de dieta hiperlipídica. (Tabela I).

Tabela I. Resultados dos testes realizados *in vivo* ao final do experimento.

	CS	HS	HT	HD
AUG (mg/dL x 120min)	21646,12 ± 1750,29 ^a	24856,93 ± 2583,29 ^b	20406,87 ± 1671,14 ^a	24857,89 ± 3019,96 ^b
AUI (ng/mL x 120min)	98,83 ± 37,08 ^a	81,90 ± 20,81 ^a	26,75 ± 13,41 ^b	70,65 ± 22,75 ^a
HOMA	6,65 ± 2,59 ^a	11,59 ± 2,49 ^b	5,78 ± 1,08 ^a	11,98 ± 3,14 ^b
Quick	3,61 ± 1,65 ^a	2,93 ± 0,81 ^a	5,07 ± 1,68 ^b	3,30 ± 1,39 ^a
Kitt (% de remoção/min)	3,67 ± 0,61 ^a	2,91 ± 1,24 ^{a,c}	8,42 ± 2,72 ^b	3,24 ± 1,78 ^{a,c}
Índice de Lee	3,06 ± 0,09 ^a	3,11 ± 0,07 ^a	3,02 ± 0,10 ^a	3,10 ± 0,08 ^a
Ganho de Peso (28-160 dias) (g)	429,06 ± 66,23 ^a	484,71 ± 65,43 ^a	394,31 ± 64,15 ^a	486,57 ± 60,28 ^a
Ganho de Peso (90 - 160 dias) (g)	106,43 ± 38,26 ^a	154,75 ± 44,10 ^a	128,31 ± 34,14 ^a	200,21 ± 44,27 ^b

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HT= Hiperlipídico Treinado e HD= Hiperlipídico Destreinado. AUG= área sob a curva glicêmica durante teste de tolerância à glicose; AUI área sob a curva insulinêmica durante teste de tolerância à insulina, Kitt= taxa de remoção da glicose sérica durante teste de tolerância à insulina. ANOVA *one-way* a≠b

Em relação às concentrações de insulina tanto em jejum como em estado alimentado não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos. O perfil lipídico foi analisado e mostrou que a administração de uma dieta rica em lípidos associada ao sedentarsimo interfere na lipemia aumentando as concentrações de AGL e LDL colesterol e diminuindo HDL colesterol. As enzimas associadas ao acúmulo de gordura no fígado (AST e ALT) não apresentaram diferenças em suas relações (Tabela II).

Tabela II. Variáveis séricas ao final do experimento.

	CS	HS	HT	HD
Glicose (mg/dL)	68,05 ± 17,48 ^a	69,84 ± 11,23 ^a	76,65 ± 7,37 ^a	81,11 ± 12,88 ^a
Insulina (ng/mL)	1,88 ± 0,93 ^a	2,24 ± 0,62 ^a	1,41 ± 0,69 ^a	1,91 ± 0,60 ^a
Insulina Jejum (ng/mL)	0,43 ± 0,22 ^a	0,55 ± 0,15 ^a	0,36 ± 0,22 ^a	0,63 ± 0,34 ^a
AGL (μEq/L)	6,80 ± 2,35 ^b	13,31 ± 5,60 ^a	5,35 ± 2,31 ^b	6,70 ± 2,87 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	150,22 ± 35,11 ^a	184,43 ± 52,69 ^a	175,39 ± 39,47 ^a	181,40 ± 31,63 ^a
HDL (mg/dL)	23,14 ± 4,14 ^a	16,82 ± 2,21 ^b	23,83 ± 5,67 ^a	22,10 ± 8,36 ^a
LDL (mg/dL)	42,01 ± 17,84 ^a	51,64 ± 21,58 ^a	102,57 ± 37,37 ^b	72,17 ± 25,05 ^a
Colesterol Total (mg/dL)	93,29 ± 19,69 ^a	114,13 ± 44,93 ^a	157,20 ± 46,29 ^a	132,37 ± 29,48 ^a
AST (U/L)	11,56 ± 3,61 ^a	8,15 ± 2,88 ^a	12,63 ± 2,92 ^b	11,78 ± 2,27 ^a
ALT (U/L)	9,80 ± 3,91 ^a	7,00 ± 1,57 ^a	5,99 ± 2,43 ^a	6,60 ± 3,08 ^a
AST/ALT	1,30 ± 0,52 ^a	1,09 ± 0,39 ^a	1,92 ± 0,59 ^a	1,99 ± 1,08 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b

O tecido hepático foi analisado ao final do experimento e foi visto que o grupo HT teve menor concentração de glicogênio quando comparado aos demais grupos. Em relação ao acúmulo de gordura neste órgão, o grupo HS mostrou maior acúmulo quando comparado aos demais grupos. Quando as taxas lipogênicas foram analisadas, tanto hepática como muscular (gastrocnêmio), o grupo HT teve uma maior taxa que o grupo HD (Tabela III e IV, respectivamente). Alíquotas do músculo sóleo foram extraídas para análise de triglicerídeos, proteína e DNA sua relação proteína/DNA e nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada (Tabela V).

Tabela III. Variáveis hepáticas ao final do experimento.

Fígado	CS	HS	HT	HD
Glicogênio (mg%)	7,24 ± 2,62 ^a	5,71 ± 1,08 ^b	4,77 ± 0,81 ^b	5,31 ± 0,75 ^a
Triglicerídeos (mg/g)	11,61 ± 3,85 ^a	20,33 ± 6,47 ^b	16,01 ± 4,72 ^a	16,16 ± 3,74 ^a
Lipogênese (μmol ³H₂O Incorporado/h x g)	24,41 ± 1,81 ^a	20,09 ± 1,01 ^a	28,55 ± 10,84 ^b	17,79 ± 2,50 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; CD= Controle Destreinado; HD= Hiperlipídico Destreinado; CT= Controle Treinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b.

Tabela IV. Taxa de lipogênese no músculo gastrocnêmio ao final do experimento.

Gastrocnêmio	CS	HS	HT	HD
Lipogênese (μmol ³H₂O Incorporado/h x g)	25,21 ± 2,76 ^a	21,44 ± 2,03 ^a	31,60 ± 13,59 ^b	23,30 ± 2,81 ^c

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; CD= Controle Destreinado; HD= Hiperlipídico Destreinado; CT= Controle Treinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b.

Tabela V. Variáveis no tecido muscular sóleo ao final do experimento.

Sóleo	CS	HS	HT	HD
Triglicerídeos (mg/g)	8,32 ± 4,03 ^a	9,31 ± 7,26 ^a	10,30 ± 5,02 ^a	12,62 ± 9,24 ^a
Proteína (mg/100%)	4,16 ± 1,40 ^a	4,76 ± 1,06 ^a	5,03 ± 1,83 ^a	3,36 ± 0,75 ^a
DNA (mg/g)	0,06 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	0,05 ± 0,02 ^a
Proteína/DNA	67,54 ± 16,27 ^a	63,27 ± 12,85 ^a	73,27 ± 21,75 ^a	77,79 ± 26,58 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way*.

As gorduras de diferentes regiões (subcutânea, retroperitoneal, epididimal e mesentérica) foram extraídas para análises e foi visto que a administração da dieta rica em gordura auxilia para o aumento de gordura nessas regiões e que o treinamento físico minimiza este efeito (Tabelas VI, VII, VIII, IV respectivamente).

Tabela VI. Variáveis no tecido adiposo subcutâneo ao final do experimento.

Subcutânea	CS	HS	HT	HD
Peso Total (g)	2,82 ± 1,20 ^a	4,23 ± 2,29 ^b	3,03 ± 1,08 ^a	4,30 ± 1,54 ^a
Triglicerídeos (mg/g)	27,15 ± 9,39 ^a	23,47 ± 9,97 ^a	22,91 ± 5,26 ^a	20,96 ± 9,21 ^a
Proteína (mg/100%)	7,23 ± 1,59 ^a	7,20 ± 2,64 ^a	7,06 ± 1,31 ^a	7,40 ± 2,61 ^a
DNA (mg/g)	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,02 ^a
Proteína/DNA	150,27 ± 18,58 ^a	163,35 ± 34,81 ^a	145,27 ± 27,37 ^a	151,46 ± 35,15 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b.

Tabela VII. Variáveis no tecido adiposo mesentérico ao final do experimento.

Mesentérica	CS	HS	HT	HD
Peso Total (g)	4,53 ± 1,60 ^a	7,83 ± 3,83 ^a	5,75 ± 2,57 ^a	8,53 ± 3,85 ^b
Triglicerídeos (mg/g)	9,21 ± 3,09 ^a	11,89 ± 3,15 ^a	12,05 ± 1,89 ^a	11,32 ± 2,05 ^a
Proteína (mg/100%)	4,40 ± 2,62 ^a	3,73 ± 0,70 ^a	3,61 ± 1,18 ^a	4,43 ± 1,72 ^a
DNA (mg/g)	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
Proteína/DNA	142,11 ± 27,95 ^a	141,60 ± 40,10 ^a	169,86 ± 19,20 ^a	181,61 ± 47,36 ^a
Lipogênese (μmol ³H₂O Incorporado/h x g)	2,90 ± 0,58 ^a	1,94 ± 1,16 ^a	3,74 ± 1,44 ^a	1,90 ± 1,04 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b.

Tabela VIII. Variáveis no tecido adiposo retroperitoneal ao final do experimento.

Retroperitoneal	CS	HS	HT	HD
Peso Total (g)	6,41 ± 3,60 ^a	10,17 ± 3,04 ^b	5,68 ± 2,09 ^a	9,36 ± 2,62 ^b
Triglicerídeos (mg/g)	15,83 ± 4,22 ^a	15,36 ± 6,04 ^a	10,07 ± 3,27 ^a	13,35 ± 5,37 ^a
Proteína (mg/100%)	4,59 ± 1,42 ^a	4,40 ± 0,94 ^a	4,83 ± 1,25 ^a	4,26 ± 1,51 ^a
DNA (mg/g)	0,04 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
Proteína/DNA	144,83 ± 60,48 ^a	181,08 ± 44,92 ^a	192,28 ± 39,82 ^a	143,82 ± 38,59 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *one-way* a≠b; c≠d; e≠f; g≠h.

Tabela IX. Variáveis no tecido adiposo epididimal ao final do experimento.

Epididimal	CS	HS	HT	HD
Peso Total (g)	4,65 ± 1,29 ^a	7,24 ± 2,71 ^b	4,83 ± 2,46 ^a	7,57 ± 3,06 ^b
Triglicerídeos (mg/g)	10,15 ± 3,79 ^a	10,00 ± 3,30 ^a	12,54 ± 2,69 ^a	12,12 ± 2,15 ^a
Proteína (mg/100%)	3,98 ± 1,62 ^a	4,00 ± 1,43 ^a	5,19 ± 1,58 ^a	4,96 ± 1,22 ^a
DNA (mg/g)	0,02 ± 0,010 ^a	0,02 ± 0,007 ^a	0,02 ± 0,004 ^a	0,02 ± 0,010 ^a
Proteína/DNA	217,77 ± 46,39 ^a	197,67 ± 46,89 ^a	260,00 ± 51,22 ^a	219,99 ± 52,27 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão ao final do período experimental (n=10/grupo). CS= Controle Sedentário; HS= Hiperlipídico Sedentário; HD= Hiperlipídico Destreinado e HT= Hiperlipídico Treinado. ANOVA *two-way* a≠b; c≠d; e≠f; g≠h.

5. Conclusão

A partir dos presentes achados, foi possível concluir que:

- É possível a realização de testes para determinação da capacidade aeróbia de ratos recém-desmamados;
- A prática regular de exercício físico moderado desde o desmame até a idade adulta (90 dias) promove alterações benéficas no que tange o metabolismo da glicose, obesidade e acúmulo de gordura hepática;
- A administração de uma dieta hiperlipídica induz o desenvolvimento da obesidade e acúmulo de gordura hepática, mas que há diferenças significativas nos resultados dependendo da dieta controle a ser usada e de como é ofertada;
- O acúmulo de gordura corporal unido com o desenvolvimento da DHGNA no presente estudo, não alteraram de maneira simbólica as variáveis séricas;
- O destreinamento aliado a uma dieta rica em gordura pode neutralizar os efeitos decorrentes da prática de exercício físico, por induz a um maior ganho de peso.

Referências

1. ACHTEN J, GLEESON M, JEUKENDRUP A. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. **Med Sci Sports Exerc**, 34:92-97, 2002.
2. ACHTEN J, JEUKENDRUP AE. Maximal fat oxidation during exercise in trained men. **In J Sports Med**, 24:603-608, 2003.
3. ADAMS LA, ANGULO P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabet Med**, 22:1129-33, 2005.
4. ALBA LM, LINDOR K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v.17 p.977-86, 2003.
5. ANDERSON, G. S. & RHODES, E. C. A review of blood lactate and ventilatory methods of detecting transition thresholds. **Sports Medicine**, v.8(1), p.43-55, 1989.
6. ANGULO P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **N Engl J Med**, v.346 p.1221-31, 2002.
7. ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology**, in press.

8. BACON, L. & KERN, M. Evaluating a test protocol for predicting maximum lactate steady state. **Journal of Sport Medicine Physiology & Fitness**, v.39, p.300-308, 1999.
9. BALIKIAN JR, P.; NEIVA, C.M.; DENADAI, B.S. Effect of an acute beta-adrenergic blockade on the blood glucose response during lactate minimum test. **J Sci Med Sport**. Sep 4 (3): 257-65, 2001.
10. BASSUK S.S.; MANSON J.E. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Journal of Applied Physiology**, v.99, p.1193-1204, 2005.
11. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **European Journal of Applied Physiology**, v. 89, p.95-9, 1995.
12. BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **European Journal of Applied Physiology**, v.89, p.95-9, 2003b.
13. BENEKE, R.; HUTLER, M.; LEITHAUSER, R.M. Dependence of the maximal lactate steady state on the motor pattern of exercise. **Br J Sports Med**. Jun 35 (3):192-6, 2001.

14. BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol*, 1968; 40:527-528
15. BENEKE, R.; HUTLER, M.; LEITHAUSER, R.M. Maximal lactate-steady-state independent of performance. **Medicine and Science in Sport and Exercise**, v.32, p.1135-9, 2000.
16. BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in rowing. **Med. Sci. Sport Exerc.** 27: 863-867, 1995.
17. BILLAT, V.L.; SIVERENT, P.; PY, G.; KORALLSZTEIN, J-P.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Medicine**, v.33, n.6, p.407-26, 2003.
18. BRAGA, L.R.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 54, n. 1, p. 58-65, 2004.
19. BROOKS, G. A.; Current concepts in lactate exchange. **Med. Sci. Sport Exerc.** V. 23, p. 895-906, 1991.
20. BRUNT EM. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol**, v.22 p.330-8, 2005.

21. BURT AD, MUTTON A, DAY C. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin Diagn Pathol**, v.15 p.246–258, 1998.
22. CALDWELL SH, CRESPO DM, KANG HS, et al. Obesity and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v.127 p.97-103, 2004.
23. CAMPBELL, C.S.G. **Influência da administração de glicose e cafeína sobre a intensidade de exercício correspondente a Máxima Fase Estável de Lactato determinada pelo Lactato Mínimo e pela Glicemia Mínima**. Dissertação de Mestrado, UNESP: Rio Claro, 1998.
24. CONWAY B, RENE A. Obesity as a disease: no lightweight matter. **Obes Rev**. v.5 p.145-51, 2004.
25. DÂMASO, A. *Obesidade*. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
26. DIEHL AM. Nonalcoholic steatohepatitis. **Sem Liver Dis**. v.19 p.221-229, 1999.
27. DURSTINE JL, HASKELL WL. Effects of exercise on plasma lipids and lipoproteins. **Exerc Sport Sci Ver**, 22:477-521, 1994.
28. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

29. EBBELING CB, PAWLAK DB, LUDWIG DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. **Lancet**. v.360 p.473-82, 2002.
30. ELOBEID MA, ALLISON DB. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v.15 p.403-8, 2008.
31. ENGELS, R.C, JONES, J.B. – Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal. Biochem**, 88: 475-84, 1978.
32. EZZATI M, LOPEZ AD, RODGERS A, VAN DER HOORN S, MURRAY CJL and the Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, v.360 p.1347-1360, 2002.
33. FERNANDES, R A ; ZANESCO, A . Early physical activity promotes lower prevalence of chronic diseases in adulthood. Hypertension Research **JCR**, p. 1-6, 2010
- 34.
35. FISBERG M. Atualização em obesidade na infância e adolescência. Ed. Atheneu, 2004;236.

36. GAUDIO AD, BOSCHI L, GAUDIO GAD. Liver change in obese patients. **Obesity Surgery** 2000;802-4.
37. GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J.R.M.; SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v.130A, p.21-7, 2001.
38. GOLDBERG, I. J. and GINSBERG, H. N. Ins and Outs Modulating Hepatic Triglyceride and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**;130:1343–1346; 2006.
39. GOODYEAR, L.J.; KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Journal of Biochemistry**, v.49, p.235-261, 1998.
40. GREEN HJ, HOUSTON ME, THOMSON JA, SUTTON JR, GOLLNICK PD. Metabolic consequences of supramaximal arm work performed during prolonged submaximal leg work. **J Appl Physiol**, 46:249-255, 1979.
41. GREENWAY F, SMITH R. The future of obesity research. *Nutrition*. 2000;16:976-82.

42. GUEDES, D. P. et al. Fatores de risco cardiovasculares em adolescentes: indicadores biológicos e comportamentais. **Arq Bras Cardiol.** v. 86 p. 439-50, 2006.
43. HECK, H.; A. MADER.; G. HESS.; S. MUCK and W. HOLLMAN. Justification of the 4,0 mmol/L lactate threshold. **Int. J. Sports Med.** 6: 117-130, 1985.
44. HEIDELBAUGH JJ, BRUDERLY M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. **Am Fam Physician**, 74:756-62, 2006.
45. HERBERT, V. et al. Coated Charcoals immunoassay of insulin. **J. Clin Endocrinol Metab.**, v.25, p.1375-84, 1965.
46. KINDERMAN, W.; G. SIMON and J. KEUL. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **Eur. J. Appl. Physiol.** 42: 25-34, 1979.
47. LOUTHAN MV, BARVE S, MCCLAIN CJ, JOSHI-BARVE S. Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **J Pediatr**, v.147 p.835-8, 2005.
48. LUDWIG J, VIGGIANO TR, MCGILL DB, OH BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin Proc**, v.55 p.434-8, 1980.

49. MACINTOSH, B.R.; ESAU, S.; SVEDAHL, K. The lactate minimum test for cycling: estimation of the maximal lactate steady state. **Can J Appl Physiol.** Jun 27 (3): 232-49, 2002.
50. MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int. J. Sports Med.** 7(suppl=1): 45-65, 1986.
51. MAGAREY AM, DANIELS LA, BOULTON TJ, COCKINGTON RA. Predicting obesity in early adulthood from childhood and parental obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.27 p.505-13, 2003.
52. MARTI A, MARCOS A, MARTINEZ J. Obesity and immune function relationships. **Obes Rev.** 2:131-40 2001.
53. MENDES MJFL; ALVES JGB, ALVES AV, SIQUEIRA PP, FREIRE EFC. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** 6 (1):S49-S54, 2006.
54. MELLO, MAR ; MOURA, LP ; RIBEIRO, C ; BARBANERA, P ; DALIA, RA ; CAMBRI, L ; VOLTARELLI, F ; REIS, IGM ; ARAUJO, G.G. ; BECK, W. R. ; MANCHADO, F ; GOBATTO, C. A. . Determination of anaerobic threshold in weanling rats by lactate minimum test.. In: 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2010, Antalya. Book of Abstracts 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2010. v. 15. p. 171-172.

55. MORETTO M, KUPSKI C, MOTTIN CC, et al. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. **Obes Surg**,13:622-4, 2003.
56. MOTA C et al., Training exercise at the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in neonatal alloxan treated rats. **BMC Endocrine Disorders**, 8:11, 2008.
57. MOURA LP, CHIYODA A, TEIXEIRA CVL, SPONTON CHG, COELHO FGM, LIMA MCS, HERNANDEZ SSS, VITAL TM, FERNANDES RA, MELLO MAR. Effects of Exercise and Cinnamon Extract on Blood Chemistry of Type 1 Diabetic Rats. *JEPonline* 2010;13(2):1-10.
58. MULHALL BP, ONG JP, YOUNOSSI ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. **J Gastroenterol Hepatol**, 17:1136-43, 2002.
59. NEIVA, C. M.; BUNC, V.; MELLO, M. Glicemia, insulinemia e trigliciridemia de ratos diabéticos experimentais e alimentados com dieta hiperlipídica, submetidos a treinamento físico por aeróbio e anaeróbio. **Revista Cient. da Univ. de Franca**, 1999.
60. NEUSCHWANDER-TETRI BA, CALDWELL SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. **Hepatology**, 37:1202-19, 2003.

61. NUNES W.M.; MELLO, M.A.R. metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, PR, v. 48, n. 4, p. 541-548, 2005.
62. OLIVEIRA, C.A.M.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. The role of exercise on long term effects of alloxan administered in neonatal rats. *Experimental Physiology*, v.90, p.79-86, 2005.
63. OMS, Organização Mundial de Saúde. WHO consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. WHO/ NCD/NCS/99. 2: 31-33.
64. PARDEE PE, LAVINE JE, SCHWIMMER JB. Diagnosis and treatment of pediatric nonalcoholic steatohepatitis and the implications for bariatric surgery. **Semin Pediatr Surg**, v.18 p.144-151, 2009.
65. PELLANDA LC, et al. Doença isquêmica: a prevenção inicia durante a infância. **Jornal de Pediatria**, 78(2): 91-96, 2002.
66. PINTO, A. L. S.; LIMA, F. R. Atividade física na infância e adolescência. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 41, n. 4, p. 242-246, 2001.
67. PRUETT EDR. FFA mobilization during and after prolonged severe muscular work in men. **J Appl Physiol**, 29:809-815, 1970.

68. REAVEN GM. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37:1595-600, 1988.
69. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**. v.123 p.1939-51, 1993.
70. REIS KAA; ROQUETE MLV, PENNA FJ. Esteatohepatite não-alcoólica na infância e adolescência: revisão. **Pediatria**, 23(4):329-39, 2001.
71. RIBEIRO, R. Q. C. et al. Fatores adicionais de risco cardiovascular associados ao excesso de peso em crianças e adolescentes. O estudo do coração de Belo Horizonte. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 6, p. 408-418, 2006.
72. ROBINSON, A. M. & WILLIAMSON, D. H. Control of glucose metabolism in isolated acini of the lactating mammary gland of the rat: effects of oleat on glucose utilization and lipogenesis. *Biochemistry Journal*. 170, 609-613, 1978.
73. ROMIJN JA et al., Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 265:E380-E391, 1993.

- 74.ROMIJN JA, COYLE EF, SIDOSSIS LS, ZHANG X J, WOLFE RR.
Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. **J Appl Physiol**, 79:1939-1945, 1995.
- 75.SCALFANI, A., Animal models of obesity: classification and characterization. *International Journal of Obesity*, v.8, p.491-508 1984.
- 76.SCHWIMMER JB, DEUTSCH R, RAUCH JB, BEHLING C, NEWBURY R, LAVINE JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **J Pediatr**, v.143 p.500-5, 2003.
- 77.SHETH SG, FREDRIC D, CHOPRA S. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Annals of Internal Medicine**, p.137-45, 1997.
- 78.SIMÕES, H.G. **Respostas metabólicas e hormonais durante os testes de determinação do limiar anaeróbio individual e lactato mínimo**. Tese de Doutorado, UFSCar: São Carlos, 2002.
- 79.SIMÕES, H.G.; CAMPBELL, C.S.; TANO, M.H.; MELLO, F.; MAZIERO, D.C.; BALDISSERA, V. Lactate minimum test in swimming: relationship to performance and maximal lactate steady state. **Medicine Science in Sports Exercise**. 32: S 161, 2000.
- 80.SIMÕES, H.G.; DENADAI, B.S.; BALDISSERA, V.; CAMPBELL, C.S.G.
Relationships and significance of lactate minimum, critical velocity, heart

- rate deflection and 3000m track-tests for running. **J Sports Med Phys Fitness**, 2004.
81. SINAIKO A. Obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome. **J Pediatr**, 83: 3–4, 2007.
82. SJODIN, B.; JACOBS, I. On set of blood lactate accumulation and marathon running performance. **Int. J. Sports Med.** 2: 23-26, 1981.
83. SOCHA P, HORVATH A, VAJRO P, DZIECHCIARZ P, DHAWAN A, SZAJEWSKA H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.48 p.587-596, 2009.
84. TEGTBUR, U.; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25: (5): 620-627, 1993.
85. TEGTBUR, U.; MACHOLD, H.; MEYER, H.; STORP, D.; BUSSE, M.W. Determining the extent of intensive physical performance in patients with coronary heart disease. **Z Kardiol.** Sep 90 (9): 637-45, 2001.
86. UTZSCHNEIDER KM, KAHN SE. Review: The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91 p.4753-61, 2006.

- 87.VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Res.** V.35, p.1339- 1344, 2002.
- 88.WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am. J. Cardiol.** 14: 844-852, 1964.
- 89.WASSERMAN, Z. et al. Mechanisms and patterns of blood lactate increase during exercise in man. **Med. Sci. Sports Exerc.** V.18, p.344-352, 1986.
- 90.WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2005; 115, 1111–9.
- 91.WILLIAMS R. Global challenges in liver disease. **Hepatology**, 44:521-6, 2006.
- 92.ZANELLA MT, KOHLMANN JR. O, RIBEIRO AB. Treatment of obesity hypertension and diabetes syndrome. **Hypertension**, v.38 p.705-8. 2001.
- 93.Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther**, 114: 307–317, 2007.