



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

O EFEITO DE DOIS MODELOS DE TREINAMENTO CONTÍNUO OU INTERVALADO SOBRE METABOLISMO MUSCULAR E CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS INDUZIDOS POR DIETA

PRESIDENTE PRUDENTE

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

**O EFEITO DE DOIS MODELOS DE TREINAMENTO CONTÍNUO
OU INTERVALADO SOBRE METABOLISMO MUSCULAR E
CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS INDUZIDOS POR
DIETA**

Bruna Brasil Brandão

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Fisioterapia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Monteiro Seraphim

PRESIDENTE PRUDENTE

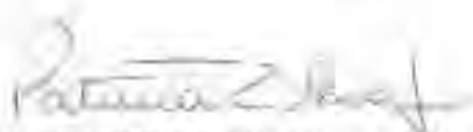
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

B817e Brandão, Bruna Brasil
O efeito de dois modelos de treinamento contínuo ou intervalado sobre metabolismo muscular e capacidade aeróbia de ratos obesos induzidos por dieta / Bruna Brasil Brandão. - Presidente Prudente : [s.n], 2012
77 f.
Orientador: Patrícia Monteiro Seraphim
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Exercício Físico. 2. Obesidade. 3. Resistência à Insulina. I. Seraphim, Patrícia Monteiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



PROFA. DRA. PATRÍCIA MONTEIRO SERAPHIM
(ORIENTADORA)



PROF. DR. JAYME NETTO JUNIOR
(UNESP/FCT)



PROFA. DRA. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA
(USP/SP)



BRUNA BRÁSIL BRANDÃO

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 02 DE FEVEREIRO DE 2012.

RESULTADO:



SUMÁRIO

Dedicatória.....	7
Agradecimento.....	8
Epígrafe.....	10
Apresentação.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	14
Introdução.....	16
Artigo I.....	22
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Métodos.....	28
Resultados.....	31
Discussão.....	32
Conclusão.....	35
Referência.....	36
Tabelas.....	39
Figuras.....	40
Legendas.....	42
Artigo II.....	43
Resumo.....	45
Abstract.....	47
Introdução.....	49

Métodos.....	51
Resultados.....	57
Discussão.....	60
Conclusão.....	64
Referência.....	66
Tabelas.....	69
Figuras.....	70
Legendas.....	74
Referências.....	76

*Aos meus pais, **José Roberto Brandão** e **Claudete Brasil Brandão**, que durante todos esses anos me apoiaram incondicionalmente, e me deram muita força e sabedoria nos momentos mais difíceis. São meus maiores exemplos de garra e perseverança.*

“Ainda mesmo quando te vejas absolutamente a sós, no trabalho de bem, sob a zombaria dos que se tresmalham temporariamente no nevoeiro da negação e do egoísmo, não esmorecerás.”

Agradeço a Deus, força maior entre todas as forças do universo, que me ensinou que o amor e o serviço ao próximo são as únicas forças capazes de sublimar a inteligência, e durante os todos esse anos me proporcionou sabedoria e discernimento para que pudesse resolver todas as minhas pendências.

Agradeço imensamente aos meus pais. Sem eles eu seria como um barco a velas em alto mar sem que houvesse um único sopro para guiá-lo.

Agradeço a minha Avó, que nesse ano completou 80 anos. Suas rugas já dizem o quanto ela se tornou um grande exemplo de vida.

Agradeço a minha grande amiga, companheira e irmã de alma, Mayla. Com ela aprendi a ser serena, paciente, aprendi a encarar a vida como olhos mais caridosos e com mais amor, além de ter sido meu porto seguro em muitos momentos difíceis.

Agradeço a minha orientadora. Por alguns bons anos me ensinou muito, me ajudou muito. Tenho certeza que fez tudo aquilo que estava ao seu alcance para que eu pudesse chegar onde estou hoje.

Agradeço aos meus amigos de trabalho. Amigos sim, em especial a Lidianne, porque foram pessoas com as quais eu dividi mais da metade de todos os meus dias nesses últimos dois anos. Com eles eu ri, chorei, bebi, comi, viajei, falei bobagens, vi pessoas queridas partindo, membros novos chegando, tudo isso me ajudou a evoluir muito como ser humano.

Agradeço a minha grande parceira e amiga Patrícia Rodrigues. Que me ajudou, me deu casa, comida e roupa lavada todas as vezes em que eu precisei ficar em São Paulo.

Agradeço por fim, todos que contribuíram para o meu crescimento tanto espiritual quanto intelectual.

“O homem é assim o árbitro constante de sua própria sorte. Ele pode aliviar o seu suplício ou prolongá-lo indefinidamente. Sua felicidade ou sua desgraça dependem da sua vontade de fazer o bem.”

(Allan Kardec)

Esta dissertação é composta de uma introdução e de dois artigos científicos, originados de pesquisas realizadas no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis) do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP – Presidente Prudente. Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, os artigos foram redigidos de acordo com as normas das revistas: Revista Brasileira de Medicina do Esporte e Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia.

Bruna Brasil Brandão, Lidiane Moreira de Souza, Beatriz de Novaes Oliveira Trombetta, Carlos Marcelo Pastre, Marcelo Papoti, Patrícia Monteiro Seraphim: APLICABILIDADE DO TESTE DE DUPLOS ESFORÇOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS INDUZIDOS POR DIETA. Submetido a apreciação, visando à sua publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte (RBME).

Bruna Brasil Brandão, Camilo de Lellis Santos Lidiane Moreira de Souza, Beatriz de Novaes Oliveira Trombetta, Silvana Auxiliadora Bordin, Patrícia Monteiro Seraphim: TREINAMENTOS CONTÍNUO E INTERVALADO MELHORAM A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM MÚSCULO ESQUELÉTICO E A CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS. Em fase de preparação para submissão à revista Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia.

Introdução: A prática regular de atividade física pode atuar como uma medida não farmacológica na prevenção e/ou tratamento das alterações metabólicas causadas pela obesidade. **Objetivo:** 1) Avaliar a aplicabilidade do teste de duplos esforços em animais saudáveis e obesos; 2) avaliar os efeitos de dois protocolos de treino, sobre a expressão gênica e atividade de proteínas envolvidas na captação de glicose estimulada pela atividade contrátil e capacidade aeróbia em ratos com obesidade induzida. **Metodologia:** Ratos machos Wistar foram alojados no biotério, sob temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Sessenta animais foram distribuídos em seis grupos com dez animais - Controle Sedentário (CS), Controle Exercício Contínuo (CEC), Controle Exercício Intervalado (CEI), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício Contínuo (OEC) e Obeso Exercício Intervalado (OEI). **Dieta:** Os animais controles foram alimentados com água e ração padrão *ad libitum*. Os grupos de ratos obesos foram alimentados com dieta hiperlipídica composta por *bacon*, mortadela, salsicha, bolacha, refrigerante, água e ração padrão *ad libitum*. **ITT:** A tolerância à insulina foi avaliada através do ITT pré e pós oito semanas de treinamento. Os animais efetuaram os testes pré e pós oito semanas de treinamento para a identificação da intensidade de limiar anaeróbio. Os grupos CEC e OEC treinaram por 30 minutos a 90% do limiar anaeróbio, 3x/sem., durante oito semanas. Os grupos CEI e OEI foram treinados acima do delta nulo a 120% da carga crítica. O treinamento intervalado consistiu na execução de 11 estímulos com 2 minutos de duração a 120% do limiar anaeróbio com intervalo passivo de 1 minuto, 3x/sem. Após 1

hora da última sessão de treinamento, os animais foram anestesiados em seguida procedeu-se a retirada do músculo esquelético gastrocnêmio. Foram utilizadas as técnicas de Western Blotting e RT-PCR para a avaliação do conteúdo proteico e expressão gênica dos genes avaliados. **Resultados:** oito semanas de treinamento melhoraram a sensibilidade à insulina de todos os animais exercitados. O teste de duplos esforços subestimou a capacidade aeróbia dos animais controles e obesos, contudo, apresentou correlação significativa com a MFEL. A expressão de AMPK α 2 e de PCG1 α foi aumentada em todos os grupos exercitados. Os treinamentos contínuo e intervalado aumentaram a atividade da pAMPK α 2 nos animais obesos exercitados. O treinamento contínuo melhorou a expressão de GLUT4 nos obesos e o intervalado melhorou nos controles. O conteúdo de RNAm de SOCS3 foi aumentado no grupo OS, contudo, ambos os programas de treino reduziram a expressão deste gene. **Conclusões:** Os animais expostos à dieta hiperlipídica apresentaram expressivo ganho de peso, aumento na quantidade de tecido adiposo e alterações na sensibilidade à insulina. Contudo, oito semanas de ambos os protocolos de treino foram capazes de amenizar o ganho de peso, melhoraram a sensibilidade à insulina além de causar ganhos na capacidade aeróbia. O teste de duplos esforços foi fidedigno em avaliar a capacidade aeróbia de todos os grupos. Ambos protocolos de treinamento aumentam a expressão gênica de proteínas envolvidas tanto no metabolismo da glicose quanto da biogênese mitocondrial independente da intensidade de esforço.

Palavras chave: Obesidade, Exercício, Capacidade Aeróbia, Metabolismo Glicídico, Biogênese Mitocondrial, GLUT4

ABSTRACT

Background: The regular practices of physical activity can be characterized as a non-pharmacological prevention and/or treatment of metabolic disorders caused by obesity. **Aim:** 1) To evaluate the applicability of double effort test for obese-induced rats; 2) To evaluate the effects of two training protocol, continuous or interval, on gene expression and protein content involved in glucose uptake stimulated by contractile activity and aerobic capacity in rats of obese-induced rats. **Method:** Sixty male Wistar rats aged 90 days were divided into 6 groups: sedentary control (SC), control continuous exercise (CCE), control intermittent exercise (CIE) obese sedentary (OS), obese continuous exercise (OCE), obese intermittent exercise (OIE). **Diet:** The control animals were fed with standard chow and water *ad libitum*. The obese groups were fed with standard chow, water and hiperlipidic diet *ad libitum*. After eight weeks of diet and at the end of eight weeks of training the insulin tolerance test and the double effort test were performed. The animals effected tests before and after eight weeks of training for identifying the anaerobic threshold intensity. The CCE and OCE groups trained for 30 minutes at 90% of anaerobic threshold, 3 times a week during eight weeks. The CIE and OIE groups were trained over the delta zero to 120% of the critical load. The groups CCE and OCE trained 30 minutes a day, three times per week, during eight week. The groups CIE and OIE performed 11 efforts with 2 minutes of duration and 1 minutes of passive interval, three times a week, during eight weeks. The euthanasia was performed after one hour of the last session of exercise and the gastrocnemius muscle was removed. For the assessment of gene expression and protein content were

performed Western blotting and RT-PCR. **Results:** Eight weeks of both training protocol improved insulin sensibility in all exercised group. The double effort test underestimated the aerobic capacity in control and obese animal respectively, however, presented significant correlation with MLSS. AMPK α 2 and PCG1 α protein content were increased in all exercised groups. Continuous and Intermittent training increased the activity of pAMPK α 2 in OCE and OIE groups. Continuous training increased GLUT4 mRNA content in obese and Intermittent training improved GLUT4 expression in control. Continuous training improved the expression of GLUT4 in the obese and the Intermittent training improved in the control group. The expression of SOCS3 was increased in OS group, although, both training program reduced this gene expression. **Conclusions:** The diet induced expressively increase on body weight and adipose tissue, in addition caused reduction on insulin sensitivity. However, eight weeks of both training protocol were able to soften the increase on body weight, improved insulin sensibility and increases aerobic capacity. The double efforts test was able to evaluate the aerobic capacity for both healthy sedentary and obese animals with insulin resistance. Both training protocols increase the gene expression of proteins involved in both glucose metabolism and mitochondrial biogenesis independent of the intensity of effort.

Key words: Obesity, Exercise, Aerobic Capacity, Glucose Metabolism, Mitochondrial Biogenesis, GLUT4.

A prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou expressivamente nos últimos 20 anos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, existem aproximadamente 1,6 bilhões de adultos (+ 15 anos) com sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25\text{kg/m}^2$) e 400 milhões de adultos obesos ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$). A estimativa para 2015 é de que esse número aumente para 2,6 bilhões de adultos com sobrepeso e 700 milhões de adultos obesos ⁽¹⁾.

No Brasil, o estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF) feito em 1975 e a pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN), desenvolvida em 1989, observou que nesse intervalo de tempo houve aumento no quadro de sobrepeso (58% em homens e 42% em mulheres) e obesidade (100% em homens e 70% em mulheres). Atualmente, o excesso de peso afeta 40% da população, sendo que, desse grupo, a obesidade atinge 11,1% ⁽²⁾⁽³⁾

Quantidades exacerbadas de gordura, particularmente localizada na região abdominal estão associadas com a resistência a insulina, hiperglicemia, dislipidemias, hipertensão e estado pro – inflamatório ⁽⁴⁾.

Até pouco tempo atrás o tecido adiposo branco era considerado apenas como um reservatório energético. Contudo, a partir de 1987, este tecido foi identificado como um órgão endócrino produtor e secreta de várias proteínas que podem alterar o metabolismo glicídico ⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

Essas proteínas são conhecidas como citocinas, possuem caráter inflamatório e são produzidas e secretadas pelo tecido adiposo. Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) são as principais citocinas

responsáveis pelo desenvolvimento de processo inflamatório precursor da resistência à insulina e Diabetes Melitus tipo 2 ⁽⁷⁾.

A liberação dessas citocinas induz aumento da expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS) ⁽⁸⁾. Embora a SOCS seja uma proteína originalmente pertencente à via de sinalização de citocinas ⁽⁹⁾, sugere-se que esta proteína também participa da redução da sinalização da insulina.

A obesidade também está relacionada com a redução da expressão da proteína transportadora de glicose (GLUT4) ⁽¹⁰⁾. Esta isoforma é expressa preferencialmente no tecido adiposo e na musculatura esquelética, e no estado basal fica internalizada, podendo sofrer translocação para a membrana plasmática sob estímulo insulínico e / ou exercício físico ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

Problemas na sinalização (citocinas pro-inflamatórias podem reduzir a fosforilação em resíduos de tirosina do receptor de insulina, diminuindo a captação de glicose) ou na produção de insulina (deficiência das células β -pancreáticas) afetam diretamente a resposta glicêmica, principais distúrbios encontrados nos portadores de RI e DM2 ⁽¹²⁾.

Outra modificação fisiológica causada pelo excesso de tecido adiposo é a redução da capacidade oxidativa celular. PIMENTA, et.al. (2008) ⁽¹³⁾ apresentou resultados onde miotubos com células do tipo L6, após 8 horas de exposição a diferentes concentrações de palmitato, a oxidação de ácidos graxos estava prejudicada.

Para que a oxidação de ácidos graxos aconteça uma proteína quinase ativada por 5'-AMP (AMPK) que atua como um importante sensor do gasto energético é ativada, fosforila e inibe a ação outra proteína conhecida como Acetil-CoA carboxilase (ACC). A ACC é responsável pela conversão de Acetil-

CoA em Malonil-CoA, que inibe a Carnitina-palmitoil-transferase-1 (CPT-1), responsável por transportar os ácidos graxos para dentro da mitocôndria onde ocorre a β -oxidação ⁽¹⁴⁾.

Em seu estudo, Pimenta et. al. (2008) ⁽¹³⁾, observou que mesmo com o aumento da atividade da AMPK, e fosforilação da ACC a beta-oxidação estava diminuída. Sugerindo o efeito negativo da exposição crônica do organismo ao excesso ácido graxo.

Sabendo que a AMPK é uma proteína importante para a homeostase energética e que sua atividade é dependente da taxa de adenosina trifosfato (ATP) intracelular, a sua suposta relação com regulação gênica do GLUT4 também é muito discutida na literatura ⁽¹⁵⁾.

Pesquisas relacionadas tanto com translocação, quanto com transcrição apontam a AMPK como fator relevante para o sucesso de tais eventos. Estudos têm buscado esclarecer como, e se, essa enzima que supostamente está envolvida na translocação do GLUT4, interfere em sua regulação gênica ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

Contudo, achados na literatura clínica e experimental têm mostrado os efeitos positivos do exercício físico como tratamento para as alterações metabólicas causadas pela obesidade.

Entre os diferentes métodos de exercício o treinamento intervalado (TI) - onde períodos de estímulo (corrida ou pedalada) são alternados com períodos de descanso – tem sido alvo de estudos ⁽¹⁸⁾.

Já em 1993, Gaitanos ⁽¹⁹⁾ e colaboradores apresentaram resultados apontando que o TI contribui para o aumento do metabolismo oxidativo para

fornecer energia diminuindo o tempo de exaustão de uma sessão de treinamento.

Este método de treino que intercala períodos de esforço intenso e descanso passivo apresenta variações nas intensidades de estímulo e de recuperação. Dependendo da intensidade, o estímulo pode durar segundos ou até mesmo minutos ⁽²⁰⁾.

Segundo Gibala et. al. (2009) ⁽²¹⁾ quando o treinamento intervalado é executado de maneira intensa pode provocar um aumento na atividade de enzimas mitocôndrias e melhora a performance durante atividades que dependem do metabolismo aeróbio. Outras adaptações geradas após semanas de treinamento intervalado de alta intensidade incluem aumento no conteúdo de proteínas associadas ao transporte e oxidação de glicose e ácidos graxos.

O aumento do gasto energético causado pelo treinamento intervalado de alta intensidade diminui a taxa de ATP intracelular ativando a AMPK. Sua atividade é intensa na musculatura esquelética durante a contração muscular, potencializando a utilização de ácidos graxos e/ou de glicose em resposta ao exercício e a magnitude de sua ativação é intensidade-dependente ⁽²²⁾⁽²³⁾.

Tjønnha e colaboradores (2008), ⁽²⁴⁾ em um estudo piloto feito com portadores da Síndrome Metabólica (SM) evidenciaram que exercício intervalado de alta intensidade foi mais eficiente em reverter fatores de risco da SM em comparação ao exercício contínuo de intensidade moderada, além de melhorar a capacidade aeróbia.

A baixa capacidade aeróbia pode ser considerada como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares de doenças metabólicas ⁽²⁴⁾.

Assim um programa de treinamento que contribua para a redução de processos inflamatórios, melhore o metabolismo glicídico, aumente a capacidade oxidativa e interfira de maneira positiva na capacidade aeróbia pode ser uma interessante intervenção não farmacológica para a prevenção e/ou tratamento.

Devido a grande necessidade de aprofundar o conhecimento em relação às ações, funções e alterações causadas pelo tecido adiposo e diferentes protocolos de exercício em diversas intensidades e algumas limitações nas investigações com humanos, é crescente a aplicação e validação de protocolos de teste e programas de treinamento que utilizem modelos experimentais com ratos e que determinem a capacidade aeróbia e intensidade de treinamento através das concentrações lactacidêmica. ⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

O ácido láctico foi descoberto em 1808 por Barzelius, contudo, o seu metabolismo ainda não está bem estabelecido. Muitos pesquisadores tentam entender as suas ações ⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. Vários testes já foram desenvolvidos para a determinação da capacidade aeróbia através das concentrações do lactato sérico.

Em 2011 Manchado-Gobatto ⁽³⁰⁾ adaptou e validou (utilizando animais em esteira rolante) o teste de duplos esforços proposto por Chassain em 1986, Este protocolo é muito interessante devido a sua fácil aplicabilidade e por não ser exaustivo acredita-se que possa ser aplicado em modelos animais que apresentem um quadro de obesidade instalada e/ou possuam alguma desordem metabólica.

Sendo assim, visamos com esse trabalho aplicar e validar o protocolo de teste de duplos esforços adaptado por Manchado-Gobatto (2011) ⁽³⁰⁾ em

animais obesos por dieta hiperlipídica com alterações na sensibilidade à insulina e avaliar os efeitos de dois protocolos de treino, contínuo ou intervalado sobre a expressão gênica e atividade de proteínas envolvidas na captação de glicose estimulada pela atividade contrátil e capacidade aeróbia em ratos com obesidade induzida.

Para isso elaboramos dois trabalhos que serão apresentados em seguida. O primeiro deles, intitulado “Validação de teste de duplos esforços para avaliação da capacidade aeróbia de ratos obesos induzidos por dieta”.

O segundo, intitulado: “Treinamentos contínuo e intervalado melhoram a expressão e atividade de proteínas envolvidas na captação de glicose em músculo esquelético e a capacidade aeróbia de ratos obesos”.

TÍTULO

APLICABILIDADE DO TESTE DE DUPLOS ESFORÇOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS INDUZIDOS POR DIETA

Applicability of double effort test to evaluate aerobic capacity of obese-induced rats

Autores: Bruna Brasil Brandão¹, Lidiane Moreira de Souza², Beatriz de Novaes Oliveira Trombetta², Carlos Marcelo Pastre¹, Marcelo Papoti², Patricia Monteiro Seraphim¹

- 1- Departamento de Fisioterapia, Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.
- 2- Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim – Departamento de Fisioterapia – Laboratório GPFis, Bloco III – FCT / UNESP – Rua Roberto Simonsen, 305 – Centro Educacional – CEP: 19060-900 – Presidente Prudente – SP – Email: patricia@fct.unesp.br

Resumo

Introdução: Devido a grande necessidade em aprofundar o conhecimento em relação às ações do lactato e algumas limitações nas investigações com indivíduos saudáveis ou portadores de transtorno metabólico, este estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do teste de duplos esforços em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Metodologia:** Quatorze ratos machos wistars foram divididos em dois grupos: Controle (Con) e Obeso (Obe). Os animais controles foram alimentados com ração-padrão e água fornecida *ad libitum*. O grupo de ratos obesos foi alimentado com ração padrão e dieta hiperlipídica. Após doze semanas do início da dieta foi realizado o teste de tolerância à insulina, Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) e o teste de duplos esforços. A dieta foi eficiente para induzir a obesidade nos animais. **Resultados:** Os animais obesos apresentaram redução na sensibilidade à insulina de aproximadamente 19% (Con= $2,156 \pm 0,1187$ UA vs Obe= $1,742 \pm 0,1551$ UA). No teste de máxima fase estável a concentração de lactato e velocidade correspondente ao limiar anaeróbio foram $3,780 \pm 0,09$ mmol/L e 18 m.min^{-1} , para ambos os grupos. A velocidade de limiar estimada pelo teste de duplos esforços foi de $15,59 \pm 0,653 \text{ m.min}^{-1}$ para os animais controles e $14,02 \pm 0,565 \text{ m.min}^{-1}$ para os animais obesos. O teste de duplos esforços subestimou a capacidade aeróbia dos animais controles em 13% e obesos em 8,7%, contudo, apresentou correlação significativa com a MFEL ($r = 0,88$; $P < 0,0075$ controles / $r = 0,92$; $P < 0,0031$ obesos). **Conclusão:** O teste de duplos esforços é capaz de avaliar a capacidade aeróbia tanto de animais sedentários saudáveis como de animais obesos resistentes à insulina.

Palavras chave: Obesidade, Ácido Lático, Velocidade Crítica.

Abstract

Background: There is little knowledge about lactate actions and some limitations in studies involving healthy individuals or patients with some metabolic disorder. **Aim:** Therefore, this study aimed to evaluate the applicability of double effort test for obese-induced rats. **Method:** Fourteen male Wistar rats were divided into two groups: Control (Con) and Obese (Obe). The control group was fed with standard chow and water *ad libitum*. The obese group was fed with standard chow, water *ad libitum* and hyperlipidic diet. Twelve weeks after the beginning of the hyperlipidic diet, insulin tolerance test, Maximal Lactate Steady State (MLSS) and the double efforts test were performed. **Results:** The diet was effective for inducing obesity. The obese group decreased insulin sensitivity in approximately 19% (Con= 2.156 ± 0.1187 AU vs Obe= 1.742 ± 0.1551 AU). The lactate concentration and velocity of Anaerobic threshold at MLSS test were 3.780 ± 0.09 mmol/L e $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ in both groups. The velocity of anaerobic threshold estimated by double efforts test was $15.59 \pm 0.653 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ to controls animals and $16.42 \pm 0.672 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ to obese animals. The double effort test underestimated 13% and 8.7% the aerobic capacity in control and obese animal respectively, however, presented significant correlation with MLSS ($r = 0,88$; $P < 0,0075$ controls / $r = 0,92$; $P < 0,0031$ obese). **Conclusion:** So, the double efforts test is able to evaluate the aerobic capacity for both healthy sedentary and obese animals with insulin resistance.

Keys Word: Obesity, Lactic Acid, Critical Power.

Introdução

Em 1808, Barzelius observou que o ácido láctico era produzido na musculatura de veados quando estes eram caçados ⁽¹⁾. Aproximadamente dois séculos mais tarde, o metabolismo do lactato ainda não está bem esclarecido necessitando maior entendimento sobre a produção, acúmulo, remoção e função deste ácido (Lactato + íons de hidrogênio) durante repouso e contração muscular ⁽²⁾⁽³⁾.

Muitos pesquisadores tentam entender as ações do lactato ⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾. Em 1964, WASSERMAN & Mc LLORY introduziram o termo “Limiar Anaeróbio” que poderia caracterizar o ponto de inflexão da curva lactacidêmica, momento em que é encontrada a zona de transição entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio onde as concentrações de este ácido encontra-se aproximadamente a 4,0 mmol/L ⁽⁷⁾. Desde então vários testes foram desenvolvidos para mensurar a capacidade aeróbia, como a máxima fase estável de lactato (MFEL), que pode ser definida como a maior intensidade no qual as concentrações de lactato se mantem estáveis em exercício de longa duração, sendo o ponto de equilíbrio entre a produção e remoção do lactato ⁽⁸⁾. O protocolo que avalia a MFEL consiste na aplicação de vários testes em diferentes intensidades com duração de 30 minutos realizados em dias distintos. Para cada intensidade são coletadas amostras de sangue a cada cinco minutos de esforço ⁽⁹⁾. Este teste é capaz de mensurar de maneira individual e fidedigna o momento de transição metabólica, sendo considerado padrão ouro para a validação de outros protocolos de teste de limiar anaeróbio ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

Além da MFEL, outros testes invasivos - lactato mínimo ⁽⁸⁾, *on set blood lactate* (OBLA) obtido pela concentração fixa de 4mmol/L de lactato ⁽¹²⁾, teste de duplos esforços ⁽¹³⁾ - e não invasivos - Potencia Crítica ⁽¹⁴⁾ - são capazes de avaliar a capacidade aeróbia. Contudo, devido a grande necessidade de aprofundar o conhecimento em relação às ações do lactato e algumas limitações nas investigações com humanos, é crescente a aplicação e validação de protocolos que avaliam a capacidade aeróbia em modelos experimentais utilizando ratos ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.

Em 2011, Manchado-Gobatto ⁽¹⁷⁾ e colaboradores validaram o protocolo não exaustivo de duplos esforços em esteira rolante utilizando ratos Wistar sedentários. Este teste proposto por Chassain (1986) ⁽¹³⁾ e adaptado por Manchado-Gobatto (2011) ⁽¹⁷⁾ consiste na execução de dois esforços de cinco minutos em cada intensidade, separados por dois minutos de repouso entre eles, com coleta de sangue para análise lactacidêmica ao final do primeiro e segundo esforços, calculando-se o delta lactato nulo com estes valores. Acreditamos que por ser um teste que não acarreta a exaustão do organismo, a sua validação e aplicabilidade em populações que possuam alguma limitação na execução de esforços físicos ou alguma doença crônico-degenerativa é muito relevante.

As principais causas para o aumento de peso em forma de gordura estão relacionadas a fatores ambientais como mau hábito alimentar e inatividade física ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾. Dessa maneira, as principais medidas a serem tomadas para a prevenção e/ou tratamento da obesidade e doenças relacionadas são reeducação alimentar e a prática de exercício físico regular ⁽²⁰⁾⁽²¹⁾. Assim, o objetivo do presente estudo foi validar o protocolo de teste de

duplos esforços proposto por Chassain (1986) e adaptado por Manchado-Gobatto (2011) em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

Métodos

Ratos machos Wistar pesando em torno de 200g foram alojados no biotério, divididos em grupos de sete animais por gaiola, sob temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 07h00min. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 74/2009.

Indução de obesidade

Quatorze ratos foram distribuídos em dois grupos com sete animais - Controle (Con) e Obeso (Obe). Os animais controles foram alimentados com ração-padrão (marca SUPRA LAB – Alisul Ind. Alimentos Ltda., São Leopoldo/RS; com composição de 25% de proteínas, 3% de lipídeos, 18% de fibras, 11% de material mineral, 2% de cálcio e 0,5% de fósforo) e água fornecida *ad libitum*. O grupo de ratos obesos foi alimentado com dieta hiperlipídica composta por *bacon*, mortadela, salsicha, bolacha, refrigerante e ração padrão, numa proporção de aproximadamente 2:2:2:1:1:1, respectivamente, numa composição de 28% de carboidratos, 13% de proteínas e 59% de lipídeos, a partir do segundo mês de vida ⁽²²⁾. Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução de peso corpóreo.

Teste de tolerância à insulina

O teste consiste na administração de insulina regular, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose ao longo de 25 minutos. O teste foi realizado ao final das doze semanas de dieta, antes de dar início aos protocolos que avaliaram a capacidade aeróbia dos ratos. Os animais permaneceram 6 horas em jejum de água, ração e dieta. Foi realizada pequena secção na extremidade distal da cauda dos animais para realização das coletas das amostras de sangue. A primeira coleta foi realizada antes da administração de insulina (basal) intraperitoneal. Foi administrada 1 U / Kg de peso corpóreo de solução de insulina regular (Novolin 100U / ml) com salina 0,9% + BSA 0,25%. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos basal (0 minuto), cinco, dez, quinze, vinte e vinte e cinco minutos, após a administração de insulina. A glicemia foi verificada por meio de glicofitas e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil). Esse procedimento foi realizado sempre no período da tarde para manter o mesmo estado de sensibilidade insulínica dos animais, e foi executado de forma idêntica para todos os grupos. Posteriormente, foi calculada a constante de decaimento (kITT expressa em %/min.) a partir da regressão linear das concentrações de glicemia obtidas durante o teste ⁽²³⁾.

Adaptação a esteira rolante

Após doze semanas de dieta hiperlipídica, anteriormente à realização do teste de Máxima Fase Estável de Lactato e o teste não exaustivo de duplos esforços (Chassain), houve a necessidade de seleção prévia dos ratos “corredores” para a composição da amostra, com duração de sete dias. Cada animal correu cinco minutos por dia a uma velocidade de 10 m.min⁻¹. Foram selecionados os animais que conseguiram terminar com sucesso entre seis e

sete sessões. Após o período de seleção, os animais corredores passaram por um processo de adaptação à esteira rolante. Este processo ocorreu ao longo de duas semanas com sessões de exercício, três vezes por semana, com velocidades crescentes (5-15 m.min⁻¹), e duração máxima de 15 min cada sessão, adaptado de ⁽¹⁷⁾. Após o período de adaptação, os animais efetuaram os testes para a identificação da intensidade de limiar anaeróbio.

Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)

Os ratos foram submetidos a quatro testes contínuos em velocidades equivalentes a 10, 15, 18, 22 m.min⁻¹. Cada animal realizou os quatro testes, com intervalo de 48 horas entre eles. A sequência de velocidades foi distribuída randomicamente. Para cada velocidade, os animais permaneceram em corrida contínua por 25 minutos. Amostras sanguíneas foram extraídas da cauda dos ratos em seis momentos: basal, 5, 10, 15 20 e 25 minutos de teste. Após a análise lactacidêmica um gráfico foi plotado e a mais alta velocidade de corrida na qual houve um aumento igual ou inferior 1 mmol/L do 10º ao 25º minuto de exercício foi considerada como equivalente a MFEL ⁽¹⁰⁾⁽²⁴⁾.

Teste de Chassain

O teste foi composto por dois esforços de 5 minutos de duração com intervalo passivo de 2 minutos entre eles nas velocidades 10, 15 e 20 m.min⁻¹. Cada animal realizou o teste nas três intensidades, escolhidas randomicamente, com intervalo de 48 horas entre elas ⁽¹⁶⁾.

A carga crítica foi determinada utilizando os resultados do teste de Chassain (Figura 1). Este valor foi calculado para cada animal que realizou o teste. Os valores podem ser vistos nas Tabelas 01 e 02 na Seção de Resultados.

Inserir Fig 1

Análise lactacidêmica

A análise lactacidêmica foi realizada a partir de amostras de 25 µl de sangue que foram coletadas da proximidade distal da cauda do animal em capilar heparinizado após o primeiro esforço e após o segundo esforço em cada velocidade relacionada acima. Estas amostras foram imediatamente transferidas a tubos de 1,5 ml, contendo 50 µl de solução de NaF a 1% e armazenadas em gelo, para posterior leitura eletroenzimática (YSL 2700 STAT, Yellow Springs Co., EUA).

Análise estatística

A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação dos valores de peso corporal foi utilizado o teste de ANOVA com medidas repetidas. Para avaliar a sensibilidade à insulina foi utilizado o teste T não pareado. O teste de Correlação de Person foi utilizado para avaliar a correlação entre os testes de Limiar Anaeróbio. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de $P < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows.

Resultados

A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica iniciada quando os animais estavam com dois meses de vida. Foi observado aumento de peso corpóreo no grupo obeso já a partir da quarta semana de dieta (Figura 2).

Inserir Fig. 2

O grupo obeso apresentou redução na sensibilidade à insulina em aproximadamente 19% após 12 semanas de dieta (Figura 3) e antes de realizar protocolo de treinamento.

Inserir Fig. 3

Os valores de delta lactato aumentaram progressivamente conforme os incrementos na velocidade de esforço. Não foi observada diferença estatística entres os grupos no teste de duplos esforços. No teste de máxima fase estável a concentração de lactato e velocidade de limiar anaeróbio foram 3.780 ± 0.09 mmol/L e 18 m.min^{-1} , respectivamente, para ambos os grupos (Figura 4).

Inserir Fig. 4

A velocidade de limiar estimada pelo teste de Chassain foi de $15,59 \pm 0,653 \text{ m.min}^{-1}$ ($R=0,917 \pm 0,02$) (Tabela 1) para os animais do grupo controle

Inserir Tabela 1

A velocidade de limiar estimada pelo teste de Chassain foi de $14,02 \pm 0,565 \text{ m.min}^{-1}$ ($R=0,86 \pm 0,03$) (Tabela 2) para os animais do grupo obeso.

Inserir Tabela 2

Discussão

A utilização de modelos experimentais com ratos para avaliação de parâmetros metabólicos e fisiológicos diante esforços físicos tem crescido rapidamente e tem sido extremamente fidedigno para humanos ⁽¹⁵⁾⁽²⁴⁾. No entanto ainda são escassos os estudos que avaliam a capacidade física de

animais saudáveis e principalmente animais com algum transtorno metabólico. O presente estudo avaliou a capacidade aeróbia através do método proposto por Chassain (1986) ⁽¹³⁾ adaptado por Manchado-Gobatto (2011) ⁽¹⁷⁾ em ratos magros e obesos por dieta hiperlipídica.

Metade dos animais deste estudo foi submetida a um protocolo de dieta hiperlipídica com o intuito de se tornarem obesos. Após quatro semanas de exposição a esta dieta hiperlipídica, houve aumento significativo no peso corporal dos animais do grupo obeso e redução na sensibilidade à insulina quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 2 e 3), que só receberam ração padrão como alimento, destacando o efeito obesogênico da dieta ⁽²²⁾ e a relação entre a obesidade e alterações metabólicas causadas pelo excesso de gordura ⁽²⁵⁾. As citocinas liberadas pelo tecido adiposo em excesso podem gerar um quadro de inflamação sistêmica periférica ⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾, alterando a capacidade de sinalização da insulina, iniciando um possível estado de resistência ao hormônio ⁽²⁸⁾.

A obesidade, além de alterar as funções fisiológicas ⁽²⁸⁾, pode ser considerada como fator limitante para a execução de testes físicos, mesmo em animais. A maioria dos protocolos utilizados para identificar intensidade de esforço leva o animal a momentos de exaustão física ⁽²⁴⁾, o que reduz a aplicabilidade quando se trata de animais com alguma alteração metabólica crônica ou funcional. Dessa maneira, o teste de duplos esforços é muito vantajoso para avaliar a capacidade aeróbia de animais acometidos por alguma patologia por não ser exaustivo.

Para validar o método proposto, foi aplicado o teste da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL), considerado “padrão ouro” para identificar a capacidade aeróbia ⁽¹⁷⁾ (Fig. 4).

Manchado-Gobatto et al. (2011) ⁽¹⁷⁾ validaram o protocolo de duplos esforços em esteira rolante utilizando ratos machos Wistar sedentários saudáveis. A velocidade correspondente a MFEL foi 20 m.min⁻¹ (concentração de lactato=3,90±0,03mmol/L), com o protocolo de Chassain subestimando a capacidade aeróbia dos animais em 20%, conforme considerações do próprio estudo. Os resultados deste estudo (Fig. 4) foram inferiores àqueles encontrados por Manchado-Gobatto (2011) ⁽¹⁷⁾. A intensidade correspondente a MFEL de grupo controle bem como o grupo obeso foi de 18 m.min⁻¹ (concentração de lactato = 4,13±0,139 mmol/L). O teste de duplos esforços subestimou a capacidade aeróbia dos animais em 13% (controle) e 8,7% (obesos), contudo houve correlação significativa entre os testes para os animais do grupo controle ($r = 0,88$; $P < 0,0075$) e obeso ($r = 0,92$; $P < 0,0031$) (Tabelas 1 e 2). Outros estudos, como o de Pilis et. al. (1993) ⁽²⁹⁾ e Langfort et. al. (1996) ⁽³⁰⁾, que avaliaram o LAn utilizando o teste progressivo de multiestágios, estimaram a zona de transição metabólica através de gráficos individuais das concentrações de lactato vs velocidade e encontraram intensidades de LAn superiores (25 m.mn⁻¹).

As diferenças encontradas nas concentrações lactacidêmica da MFEL e do teste de duplos esforços sugere possível existência de protocolo-dependência (Manchado-Gobatto, 2011) ⁽¹⁷⁾. Contudo, o teste de duplos esforços apresentou alta correlação com a MFEL tanto para os animais controles quanto para os animais obesos que apresentaram alterações na

sensibilidade à insulina, inferindo a possível aplicabilidade em populações com algum transtorno metabólico.

A grande limitação do estudo foi o fato dos animais não conseguirem atingir a velocidade de corrida de 25 m.min⁻¹ no teste de Máxima fase estável, o que gerou alteração nos testes para as velocidades de execução de 20 para 18 m.min⁻¹ e de 25 para 22 m.min⁻¹, diferindo das sugeridas no estudo de Manchado-Gobatto (2011) ⁽¹⁷⁾. De forma semelhante, isso provocou exclusão da velocidade 25 m.min⁻¹ utilizada no teste de Chassain, mantendo-se apenas as velocidades 5, 10 e 20 m.min⁻¹.

De fato, mais investigações são necessárias para compreender o comportamento lactacidêmico diante os diferentes modelos animais e os diversos protocolos de avaliação do LAn. Cabe ainda ressaltar a importância de analisar modelos de testes que avaliem individualmente o LAn dos animais, tendo em vista que a intensidade de trabalho pode alterar as respostas fisiológicas. Assim, métodos que estimem a capacidade aeróbia de maneira individual apresentarão resultados fidedignos e possibilitará a prescrição de um protocolo de treinamento respectivo à capacidade física de cada animal.

O teste de duplos esforços apresentou alta correlação com a MFEL, indicando sua possível aplicabilidade para avaliar a capacidade aeróbia tanto de animais sedentários saudáveis bem como de animais obesos com a sensibilidade à insulina prejudicada.

Referência

1. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *JPhysiol* 2004; 558: 5-30.
2. Hall G van. Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise. *Acta Physiol (Oxf)* 2010; 199: 499-508.
3. Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate threshold concepts: how valid are they. *Sports Med* 2009; 39: 469-490.
4. Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange durring exercise. *J Appl Physiol* 1973; 35: 236-245.
5. Brooks GA. Current concepts in lactate exchange. *Med Sci Sports Exerc* 1985; 23: 895-906.
6. Baron B, Noakes TD, Dekerle J, Moullan F, Robin S, Matran R, et. al. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med* 2008; 42: 828-833.
7. Wasserman K and Mcllory, MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolismo in cardiac patients during exercise. *Am J Cardiol* 1964; 14: 844-852.
8. Tegtbur U, Busse MW and Braumann KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc* v. 25, p. 620-627, 1993.
9. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Maximal lactate steady state in running rats. *JEP (online)* 2005; 8: 29-35.
10. Beneke T. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modelling approaches. *Eur J Appl Physiol* 2003; 88: 361-9.
11. Svedahl K e MacIntosh BR. Anaerobic Threshold: The Concept and Methods of Measurement. *Can. J. Appl. Physiol* 2003; 28: 299-323.
12. Sjödín B, Jacobs I. Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. *Int J Sports Med* 1981; 2: 23-6.
13. Chassain A. Méthode d'appréciation objective de la tolérance de l'organisme á l'effort: application á la mesure des puissances de la frequence cardiaque et de la lactatémie. *Science & Sports* 1986; 1:41-8.
14. Monod H, Scherer J. The work capacity of a synergic muscular group. *Ergonomics* 1965; 8:329-38.

15. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1-6.
16. Manchado FB, Gobatto CA, Voltarelli FA, Mello MAR. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab* 2006; 31: 731-736.
17. Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Mello MAR. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in running rats. *Indian J. Exp. Biol*, 2011; 49: 781-785.
18. D'Archivio M, Annuzzi G, Varì R, Filesì C, Giacco R, Scazzocchio B, et. al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 70-8.
19. Pinhiero ARO, Freitas SFT, Corso ACT. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Rev. Nutr.* 2004; 17: 534-533.
20. Kriska AM, Saremi A, Hanson RL, Bennett PH, Kobes S, Williams DE, et. al., Physical Activity, Obesity, and the Incidence of Type 2 Diabetes in a High-Risk Population. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 669-675.
21. Hopps E and Caimi G. Exercise in Obesity Management. *J Sports Med Phys Fitness* 2011; 51: 275-282.
22. Panveloski AC, Pinto Junior DAC, Brandão BB, Moreira RJ, Machado UF, Seraphim PM. Treinamento resistido reduz a inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. *Arq Bras Endocrinol e Metabol* 2011; 55: 155-163.
23. Pádua MF, Pádua TF, Souza CT, Silva ASR, Ropelle ECC, Cintra DE et. al. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. *Rev Bras Med Esporte* 2009; 15: n. 3.
24. 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. *Comp Biochem Physiol* 2001; 130A: 21-7.
25. Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutri Soc* 2011; 70: 408-17.
26. Pedersen BK, Febbraio MA, Mooney RA. Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol* 2006; 102: 814-816.

27. Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizuni DM, Carmo MGT. Adipocitocinas, uma nova visão do tecido adiposo. Ver. Nutr. Campinas. 20007; 20: 549-559.
28. Monteiro R. and Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. Mediators of Inflammation 2010; article ID-289645, p. 1-10.
29. Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Wojtyna J.. Anaerobic threshold in rats. Comp Biochem Physiol 1993; 106 A: 285-289.
30. Langfort, J.; Zarzeczny, R.; Pilis, W.; Kaciuba-Uscilko, H.; Nazar, K.; Porta, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. Comp Biochem Physiol 1996; 114 A: 51-55.

TABELAS

Tabela 1 – Delta lactato das intensidades (10, 15, 20 m.min⁻¹), estimativa individual da carga crítica (intercepto Y) e coeficiente linear (R²) dos animais controles – Teste de Chassain.

Animal	Δ Lactato			Velocidade de Limiar (m.min ⁻¹)	R ²
	10 m.min ⁻¹ mmol/L	15 m.min ⁻¹ mmol/L	20 m.min ⁻¹ mmol/L		
01	-0,15	0,00	0,15	15,65	0,98
02	-1,86	-0,71	0,39	18,22	0,99
03	-0,25	0,00	1,65	12,92	0,84
04	-0,48	-0,33	0,77	15,08	0,83
05	-1,87	-0,12	0,53	16,89	0,93
06	-0,30	-0,15	0,69	14,30	0,86
07	-0,68	-0,09	0,51	16,13	0,99
Média	-0,798	-0,200	0,670	15,59	0,917
EPM	0,282	0,094	0,180	0,653	0,027

Tabela 2 – Delta lactato das intensidades (10, 15, 20 m/min⁻¹), estimativa individual da carga crítica (intercepto Y) e coeficiente linear (R²) dos animais obesos - Teste de Chassain.

Animal	Δ Lactato			Velocidade de Limiar (m.min ⁻¹)	R ²
	10 m.min ⁻¹ mmol/L	15 m.min ⁻¹ mmol/L	20 m.min ⁻¹ mmol/L		
01	-0,78	-0,6	0,24	18,26	0,87
02	-0,42	-0,33	0,09	18,75	0,87
03	-0,95	-0,48	1	15,67	0,91
04	-0,27	-0,42	0,09	17,62	0,47
05	-0,95	0	0,81	15,26	0,99
06	-0,68	0,42	0,72	14,01	0,90
07	-0,38	-0,03	0,42	15,42	0,97
Média	-0,632	-0,205	0,480	16,42	0,854
EPM	0,105	0,134	0,138	0,672	0,066

Figuras

Figura 1

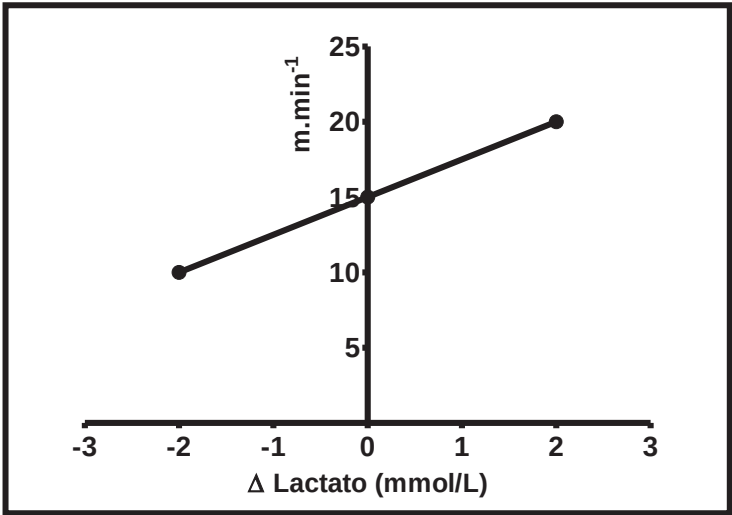


Figura 2

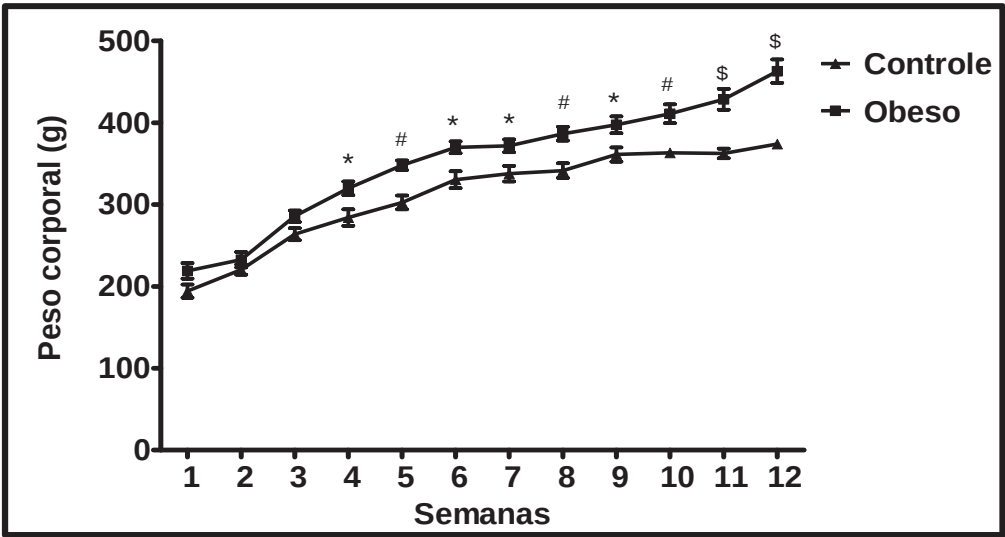


Figura 3

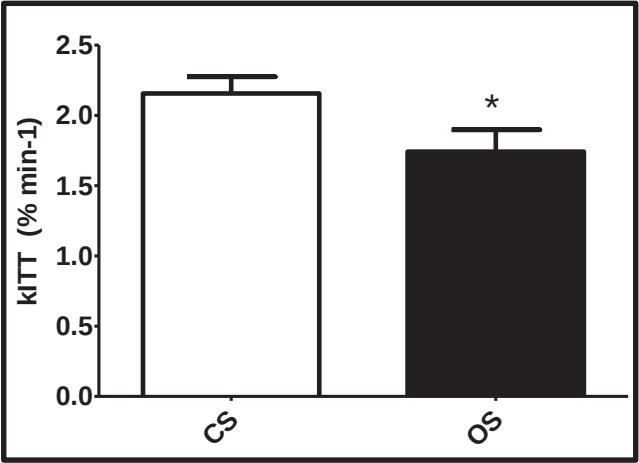
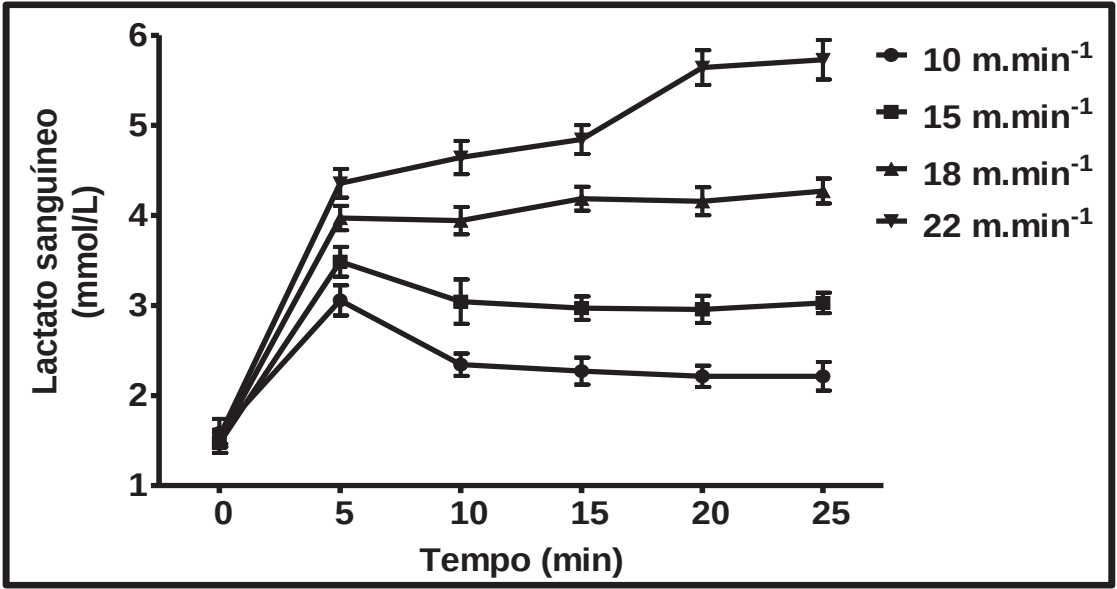


Figura 4



Legendas das figuras

Figura 1 – Exemplo da determinação da carga crítica pelo teste de Chassain. Os pontos representam o delta lactato obtido em cada intensidade. Uma regressão linear foi plotada e a velocidade de limiar corresponde ao valor do intercepto Y ($16,22 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$).

Figura 2 – Peso corporal dos animais ao longo de 12 semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle; # $P < 0,01$ vs Controle; \$ $P < 0,001$ vs Controle. (n=7)

Figura 3 – Constante de decaimento da glicose por minuto (kITT). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle (n=7).

Figura 4 – Valores de lactato sanguíneo durante o teste de Máxima Fase Estável de Lactato nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de teste (n=7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho pela disponibilidade na utilização biotério na FCT-UNESP, CAPES- Programa de pós-graduação Mestrado em Fisioterapia 2010/2011.

TÍTULO

TREINAMENTOS CONTÍNUO E INTERVALADO MELHORAM A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM MÚSCULO ESQUELÉTICO E A CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS OBESOS

Autores: Bruna Brasil Brandão¹, Lidiane Moreira de Souza², Beatriz de Novaes Oliveira Trombetta², Camilo de Lellis Santos³, Silvana Auxiliadora Bordin³, Patricia Monteiro Seraphim¹

1- Departamento de Fisioterapia, Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.

2- Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.

3- Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade de São Paulo, USP – Campus São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim – Departamento de Fisioterapia – Laboratório GPFis, Bloco III – FCT / UNESP – Rua Roberto Simonsen, 305 – Centro Educacional – CEP: 19060-900 – Presidente Prudente – SP – Email: patricia@fct.unesp.br

Resumo

Introdução: A prática regular de atividade física pode atuar como uma medida não farmacológica na prevenção e/ou tratamento das alterações metabólicas causadas pela obesidade. **Objetivo:** avaliar os efeitos de dois protocolos de treino, contínuo ou intervalado sobre a expressão gênica e atividade de proteínas envolvidas na captação de glicose estimulada pela atividade contrátil e capacidade aeróbia em ratos com obesidade induzida. **Metodologia:** Ratos machos Wistar foram divididos em seis grupos: Controle Sedentário (CS), Controle Exercício Contínuo (CEC), Controle Exercício Intervalado (CEI), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício Contínuo (OEC) e Obeso Exercício Intervalado (OEI). Os animais controles foram alimentados com ração padrão e água fornecida *ad libitum*. Os grupos obesos foram alimentados com ração padrão, água e dieta hiperlipídica. Os grupos CEC e OEC treinaram 30 minutos por dia, três dias por semana, durante oito semanas. Os grupos CEI e OEI executaram 11 estímulos com 2 minutos de duração e intervalo passivo de 1 minuto. Após oito semanas de dieta e ao final de oito semanas de treino foi realizado o teste de tolerância à insulina e o teste de duplos esforços. A eutanásia foi realizada após uma hora da última sessão de treinamento. **Resultados:** Os animais obesos apresentaram redução de 19% na sensibilidade à insulina. Após oito semanas de treinamento essa alteração metabólica foi revertida pelos dois protocolos de treinamento. Ambos os protocolos foram suficientes para aumentar a velocidade de limiar anaeróbio. A expressão de AMPK α 2 e de PCG1 α foi aumentada em todos os grupos exercitados. O conteúdo protéico de AMPK α 2 foi aumentado apenas nos grupos controles exercitados. Os animais do grupo OS apresentaram redução

no conteúdo de pAMPK α 2. Os treinamentos contínuo e o intervalado aumentaram a atividade desta proteína nos animais obesos exercitados (OEC e OEI). O conteúdo de RNAm de SOCS3 foi aumentado no grupo OS, contudo, ambos os programas de treino reduziram a expressão deste gene. **Conclusão:** Tanto o treinamento contínuo quanto o intervalado reverterem o quadro de resistência à insulina periférica, regula de maneira positiva a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo glicídico e biogênese mitocondrial, além de aumentar a atividade da AMPK α 2.

Palavras chave: obesidade, treinamento físico, AMPK α 2, biogênese mitocondrial, GLUT4, limiar anaeróbio.

Abstract:

Background: The regular physical activity can act as no-pharmacologic way to prevent and/or treat metabolic alteration caused by obesity. **Methods:** Therefore, male wistars rats 90 days years old were divided into 6 groups: sedentary control (SC), control continuous exercise (CCE), control intermittent exercise (CIE) obese sedentary (OS), obese continuous exercise (OCE), obese intermittent exercise (OIE). The control animals were fed with standard chow and water *ad libitum*. The obese groups were fed with standard chow, water and hiperlipidic diet *ad libitum*. The groups CCE and OCE trained 30 minutes a day, three times per week, during eight week. The groups CIE and OIE performed 11 efforts with 2 minutes of duration and 1 minutes of passive interval. After eight weeks of diet and at the end of eight week of training was performed the insulin tolerance test and the double effort test. The euthanasia was performed after one hour of the last session of exercise. **Results:** The obese animals reduced insulin sensibility in 19% approximately. After eight week of training this metabolic alteration was reversed in all exercised groups. Both exercise protocols were efficient to increase the anaerobic threshold velocity. AMPK α 2 and PCG1 α protein content were increased in all exercised groups. The protein content of AMPK α 2 was increased in CCE and CIE. The animals of OS group reduced their pAMPK α 2 content. Continuous and Intermittent training increased the activity of pAMPK α 2 in OCE and OIE groups. The expression of SOCS3 was increased in OS group, although, both training program reduced this gene expression. **Conclusion:** Either continuous training or interval training reverts peripheral insulin resistance, regulates in a

positivity way the gene expression of proteins involved on glucose metabolism and biogenesis mitochondrial, beyond increasing the activity of AMPK α 2.

Keys Word: obesity, physical training, AMPK α 2, mitochondrial biogenesis, GLUT4, anaerobic threshold

Introdução

O aumento da quantidade de gordura corporal possui forte relação com a redução da expressão de transportador de glicose 4 (GLUT4) e/ou prejuízo na via de sinalização da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo [1]. Além disso, gera quadro de inflamação subclínica devido ao aumento da produção e liberação de proteínas pró-inflamatórias (citocinas) como Interleucina-6(IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) [2] que influenciam diretamente a expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS) [3].

Embora a SOCS3 seja uma proteína originalmente pertencente à via de sinalização de citocinas [4], sugere-se que esta proteína também participa da redução da sinalização da insulina através de sua co-localização entre a subunidade do receptor de insulina- β (IR- β) e o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) impedindo a interação entre a subunidade IR- β e o IRS-1 o que reduz a atividade da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) [5].

No entanto, sabe-se que a prática de atividade física regular e dieta saudável podem ser consideradas opções interessantes para o tratamento e/ou prevenção da obesidade e doenças crônico-degenerativas relacionadas com aumento da quantidade de tecido adiposo [6]. O exercício físico requer grande ajuste fisiológico para aumentar a demanda de energia que é utilizada para a realização do trabalho muscular, causando aumento significativo no gasto energético [7]. Ao diminuir a taxa de adenosina trifosfato (ATP) intracelular através da contração muscular uma proteína cinase ativada por 5'-AMP (AMPK) - que atua como um importante sensor do gasto energético - é ativada atuando no processo de translocação do GLUT4 para a membrana plasmática

potencializando a captação de glicose independente da via da sinalização da insulina [8,9]. Atividades que exijam maior dispêndio de energia conseguem ativar essa via metabólica com mais eficiência [10].

Nesse contexto um programa de exercício que seja capaz de potencializar a via da AMPK causando adaptações fisiológicas relevantes que sejam eficientes em reduzir tecido adiposo, regular a homeostasia glicídica, aumentar da capacidade oxidativa e que diminua a síntese de marcadores inflamatórios pode ser considerado uma medida não farmacológica para o tratamento e/ou prevenção das patologias causadas pela obesidade.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de dois protocolos de treino, contínuo ou intervalado sobre a expressão gênica e atividade de proteínas envolvidas na captação de glicose estimulada pela atividade contrátil e capacidade aeróbia em ratos com obesidade induzida.

Materiais e Métodos

Ratos machos Wistar pesando em torno de 200g foram alojados no biotério, divididos em seis grupos de cinco animais por gaiola, sob temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 07h00min. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 74/2009.

Indução de obesidade

Sessenta ratos foram distribuídos em seis grupos com dez animais - Controle Sedentário (CS), Controle Exercício Contínuo (CEC), Controle Exercício Intervalado (CEI), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício Contínuo

(OEC) e Obeso Exercício Intervalado (OEI). Os animais controles foram alimentados com ração padrão (marca SUPRA LAB – Alisul Ind. Alimentos Ltda., São Leopoldo/RS; com composição de 25% de proteínas, 3% de lipídeos, 18% de fibras, 11% de material mineral, 2% de cálcio e 0.5% de fósforo) e água fornecida ad libitum. Os grupos de ratos obesos foram alimentados com dieta hiperlipídica composta por bacon, mortadela, salsicha, bolacha, refrigerante e ração padrão, numa proporção de aproximadamente 2:2:2:1:1:1, respectivamente, numa composição de 28% de carboidratos, 13% de proteínas e 59% de lipídeos, a partir do segundo mês de vida [11]. Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução de peso corpóreo.

Teste de tolerância à insulina

O teste foi aplicado em dois momentos diferentes: após oito semanas de dieta e após 8 semanas de treinamento. Os animais permaneceram 6 horas em jejum de água, ração e dieta. Foi realizada pequena secção na extremidade distal da cauda dos animais para realização das coletas das amostras de sangue. A primeira coleta foi realizada antes da administração de insulina (basal) intraperitoneal. Foi administrada 1 U / Kg de peso corpóreo de solução de insulina regular (Novolin 100U / ml) com salina 0.9% + BSA 0.25%. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos basal (0 minuto), cinco, dez, quinze, vinte e vinte e cinco minutos, após a administração de insulina. A glicemia foi verificada por meio de glicofitas e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil). Esse procedimento foi realizado sempre no período da tarde para manter o mesmo estado de sensibilidade insulínica dos animais, e foi executado de forma idêntica para todos os grupos.

Posteriormente, foi calculada a constante de decaimento (kITT expressa em %/min.) a partir da regressão linear das concentrações de glicemia obtidas durante o teste [12].

Adaptação à esteira rolante

Após oito semanas de dieta hiperlipídica, anteriormente à realização do teste não exaustivo de duplos esforços (Chassain) [13], houve a necessidade de seleção prévia dos ratos “corredores” para a composição da amostra, com duração de sete dias. Cada animal correu durante cinco minutos por dia a uma velocidade de 10 m.min⁻¹. Foram selecionados os animais que conseguiram terminar com sucesso entre nove e dez sessões. Após o período de seleção, os animais corredores passaram por um processo de adaptação à esteira rolante. Este processo ocorreu ao longo de duas semanas com sessões de exercício, três vezes por semana, com velocidades crescentes (5-15 m.min⁻¹), e duração máxima de 15 min cada sessão, adaptado de [13]. Após o período de adaptação, os animais efetuaram os testes para a identificação da intensidade de limiar anaeróbio.

Teste de Chassain

Os animais foram submetidos a três testes em diferentes velocidades (10, 15 e 20 m.min⁻¹) executadas randomicamente com intervalos de 48 horas entre eles, pré e pós oito semanas de treinamento. Os testes de duplos esforços foram compostos por dois estímulos de 5 minutos de duração com intervalo passivo de 2 minutos entre eles nas velocidades [14]. Amostras de sangue foram coletadas da porção distal da cauda dos animais ao final de cada estímulo para a determinação da lactacidemia. Para cada intensidade foi calculado o delta lactato através da subtração dos valores lactacidêmico do

segundo esforço menos o primeiro esforço de cada intensidade. Com o delta lactato referente nas três intensidades, uma regressão linear individual foi plotada, possibilitando a detecção do delta nulo (correspondente ao intercepto do eixo Y), equivalente à velocidade crítica.

Caracterização do treinamento

Durante a primeira sessão de treinamento da segunda e da sexta semana de ambos os protocolos, 25 µL de sangue foram coletados da porção distal da calda do animal para avaliarmos a produção de lactato durante o treino. As coletas foram feitas antes de iniciarmos a sessão de corrida (tempo 0), após 15 minutos de corrida (tempo 15) e ao final do treino (tempo 30).

Análise lactacidêmica

A análise lactacidêmica foi realizada a partir de amostras de 25 µl de sangue que foram coletadas da proximidade distal da cauda do animal em capilar heparinizado após o primeiro esforço e após o segundo esforço em cada velocidade relacionada acima. Estas amostras foram imediatamente transferidas a tubos de 1.5 ml, contendo 50 µl de solução de NaF a 1% e armazenadas em gelo, para posterior leitura eletroenzimática (YSL 2700 STAT, Yellow Springs Co., EUA).

Protocolo de Treino

Os grupos CEC e OEC foram treinados abaixo do delta nulo a 90% da carga crítica, 30 minutos por dia, três dias por semana, durante oito semanas. O treinamento contínuo consistiu em um único estímulo de 30 minutos a 90% do limiar anaeróbio. Os grupos CEI e OEI foram treinados acima do delta nulo a 120% da carga crítica, 22 minutos por dia, três dias por semana, durante oito semanas. O treinamento intervalado consistiu na execução de 11 estímulos

com 2 minutos de duração a 120% do limiar anaeróbio com intervalo passivo de 1 minuto, totalizando 32 minutos de treinamento. As cargas foram equiparadas levando-se em consideração a seguinte equação adaptada do estudo de LIRA ,(2010) [15]: $\text{Carga} = \text{tempo de estímulo} \times \% \text{ do limiar anaeróbio}$ (Carga intervalado = $22 \text{ min} \times 122\% \cong 2700 \text{ UA}$ / Carga contínuo = $30 \text{ min} \times 90\% = 2700 \text{ UA}$).

Coleta do Material

Após 1 hora da última sessão de treinamento, os animais foram anestesiados utilizando o anestésico pentobarbital sódico (40 mg/Kg peso corpóreo) por via intraperitoneal. Em seguida procedeu-se a retirada do músculo esquelético gastrocnêmio, a eutanásia encerrou-se após a retirada do coração.

Western Blotting

Amostras de músculo gastrocnêmio foram retiradas e homogeneizadas em tampão de imunoprecipitação contendo 137 mM de cloreto de sódio, 2.7 mM de cloreto de potássio, 1 mM de cloreto de magnésio, 0.5 mM de ortovanadato de sódio, 1% de Triton X 100, 10% de glicerol, 20 mM de Tris (pH 7.8), 0.2 mM de Fenilmetilsulfonilflúor, 10 mM de fluoreto de sódio, 1 mM de EDTA e 1µg/mL de aprotinina a 4°C. Os tecidos homogeneizados foram então centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas utilizando o método de Bradford e posteriormente realizada a determinação do extrato total. As análises de proteínas intracelulares pela técnica de Western blotting estão descritas a seguir: O extrato total foi ressuspensão em tampão de Laemmli, contendo 100

mmol/L de DTT (Laemmli, U.K., 1970). Após rápida fervura, foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD, como descrito por SAAD et. al., 1997. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por duas horas. A membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* com anticorpo específico. Os anticorpos utilizados foram anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-AMPK α 2, antiphospho AMPK α 2-Thr172 (Upstate, Biotechnology). Posteriormente, foi feita incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho), marcado com enzima peroxidase (HRP) (GE Helthcare, Amersham, UK), diluído 1:10000 em solução bloqueadora durante 1 hora (5% de leite em pó desnatado+ 20 ml de PBS 1X + 0.05% de Tween 20). A membrana foi lavada vigorosamente com tampão PBS 1x e colocada em contato com 5 mL da reação de quimiluminescência (Luminol 1.1%, Ácido. P-Cumárico 0.48%, Tris 1M (pH 8.5) 11.1%, H₂O destilada) por 2 minutos e, posteriormente exposta ao Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) para detecção das bandas resultantes. O filme foi então fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as imagens foram analisadas por densitometria óptica utilizando-se o software Scion Image for Windows (Scion Corporation, EUA).

Quantificação de RNAm do AMPK α 2, PGC1 α , Glut4 e SOCS3

O RNA total das amostras do músculo gastrocnêmio foi isolado com Brazol (LGCBio Biotecnologia, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas pela absorbância a 260 nm. A pureza do RNA foi determinada mediante o cálculo da relação de absorbância a 260 e 280 nm, bem como por coloração por brometo de etídio. Para transcrição reversa, 5 μ g de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos para a síntese de uma fita de DNA complementar ao mRNA (cDNA). Posteriormente, foi realizada a amplificação dos fragmentos dos genes da AMPK α 2 (Sense:5'-AATAATGAACCAAGCCAGTG-3' e Antisense:5'-CTCCGCCATAATGTCGTATG-3'), PGC1 α (Sense:5'-AAGACTATTGAGCGAACCT-3' e Antisense:5'-TTGGAATTGACTGACTGACA-3'), GLUT4 (Sense:5'-CCCCTCCAGGGCAAAGCAT-3' e Antisense:5'-TCCTGGAGGGGAACAAGAA-3') e SOCS3 (Sense:5'-CCTTTGAGGTTTCAGGAGCAG-3' e Antisense:5'-GTAGCCACGTTGGAGGAGAG-3'), por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Os produtos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose (EtBr) e visualizados com iluminação UV (Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc.). Para a análise densitométrica das bandas obtidas, foi utilizado o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para esse fim. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão da proteína desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH –

Sense:5'-AAGACTATTGAGCGAACCTT-3' e Antisense:5'-TTGGAATTGACTGACTGACA-3').

Análise estatística

A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar a sensibilidade à insulina após oito semanas de dieta foi utilizado o teste T não pareado. O teste T pareado foi utilizado para comparar os valores de limiar anaeróbio. A comparação dos valores de ganho percentual de peso corporal, sensibilidade à insulina após oito semanas de treino, da expressão gênica, conteúdo e fosforilação das proteínas foi realizado o teste de ANOVA one-way com *post-hoc* (Tukey) quando necessário. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de $P < 0.05$. O pacote estatístico utilizado foi IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows.

Resultados

A figura 1A e 1B apresentam os resultados obtidos durante a caracterização do treinamento desenvolvida na segunda e na sexta semana respectivamente. Observa-se aumento significativo na produção de lactato após 15 minutos de corrida, no entanto, as concentrações permanecem semelhantes até o final da sessão de treinamento em para ambos os protocolos.

Inserir Figura 1A e 1B

Para análise do peso corpóreo, uma regressão linear foi plotada a partir dos valores de peso dos animais e o coeficiente angular foi calculado em dois

momentos: após oito semanas de dieta hiperlipídica (figura 1A) e após oito semanas de treinamento (figura 1B). Foi observado aumento significativo no peso corporal dos animais obesos ($\approx 23\%$ vs controle) após oito semanas de exposição à dieta hiperlipídica. Entretanto, o treinamento contínuo e o intervalado foram capazes de atenuar esse aumento (CEC -31.29, CEI -27.78% vs CS e OEC -53.97% , OEI -43.75% vs OS).

Inserir Figura 2

A Tabela 1 ilustra o peso corporal e peso de tecido adiposo dos animais no dia do sacrifício. O grupo OS apresentou aumento de 20.7% no peso corporal e 115.4% no peso de tecido adiposo em relação aos animais do grupo CS. Após oito semanas de treinamento, tanto contínuo quanto intervalado, os animais exercitados apresentaram peso corporal e quantidade de tecido adiposo reduzido em relação aos grupos sedentários (CEC=-23.25%, CEI= -37.25% vs CS e OEC= -43.63%, OEI= -39.19% vs OS) .

Inserir Tabela 1

Em relação à sensibilidade à insulina observou-se que o grupo de animais submetidos a oito semanas de dieta hiperlipídica (OS) apresentou redução de aproximadamente 19% na constante de decaimento (Fig 2A). No entanto após oito semanas de treinamento contínuo ou intervalado essa alteração metabólica foi revertida em todos os grupos exercitados (CEC = +35.53%, CEI = +17.62% vs CS; OEC = +152.68% e OEI = +108.72% vs OS) (Fig. 2B).

Inserir Figura 3

Ao avaliar a capacidade aeróbia dos animais (Tabela 2), observou-se que oito semanas de ambos os protocolos foram suficientes para aumentar a velocidade de limiar anaeróbio de todos os grupos (CEC=+18.91% e CEI=+23.02%) e obesos (OEC=+27.53% e OEI=+26.37%) de maneira similar.

Inserir Tabela 2

Em relação ao conteúdo proteico de AMPK α 2 (figura 3A), observou-se aumento de 47% ($P<0.05$) no grupo CEC e 51% ($P<0.05$) no grupo CEI quando comparados ao controle sedentário (CS). Na figura 3B estão apresentados os valores de pAMPK α 2. Os animais do grupo obeso sedentário (OS) apresentaram redução de 39.25% ($P<0.05$) no conteúdo de AMPK α 2 fosforilada quando comparado ao grupo CS. No entanto, o treinamento contínuo bem como o intervalado aumentaram a atividade desta proteína nos animais obesos exercitados (OEC=264.16% e OEI=299.31%; $P<0.01$) quando comparados ao grupo OS.

Inserir Figura 4

Ambos os protocolos de treino aumentaram a expressão da AMPK α 2 (figura 4A) tanto para os grupos controles exercitados (CEC=70%, CEI= 72%, $P<0.01$) quando comparados a CS quanto para os grupos obesos exercitados (OEC=75%, $P<0.01$ e OEI =59%, $P<0.05$) quando comparados a OS. A expressão de PGC1 α (figura 4B) também está aumentada em todos os grupos exercitados quando comparados aos seus controles (CEC=62% e CEI=126% vs CS, $P<0.05$; OEC=104% vs OS, $P<0.05$ e OEI=152% vs OS, $P<0.01$).

Embora não apresente diferença estatística, os animais submetidos à dieta hiperlipídica (OS), apresentaram redução de 15% na expressão gênica do GLUT4 (figura 4C) em relação ao seu controle (CS). No entanto, após oito semanas de treinamento houve aumento na expressão do GLUT4 de 53% ($P<0.05$) no grupo OEC e 55% ($P<0.05$) no grupo CEI. O conteúdo de SOCS3 (figura 4D) está aumentado em 46% ($P<0.01$) no grupo OS quando comparado ao CS. No entanto, ambos os protocolos de treinamento reduziram a expressão deste gene (CEC= -33% e CEI= -41% vs CS, $P<0.05$; OEC= -58% e OEI= -47% vs OS, $P<0.001$).

Inserir Figura 5

Discussão

Alterações no perfil glicêmico possuem forte relação com as modificações fisiológicas causadas pelo excesso de tecido adiposo devido à produção e liberação de proteínas de caráter inflamatório como IL-6 e TNF- α . Estas proteínas, denominadas citocinas, podem regular negativamente a função do receptor de insulina, diminuir a capacidade de sinalização deste hormônio restringindo a captação de glicose [16].

Em nosso estudo, após oito semanas de exposição à dieta hiperlipídica observa-se que os animais do grupo obeso exibiram incremento de peso corporal semanal superior aos animais do grupo controle (figura 2A) além de apresentarem menor capacidade de captar glicose após um estímulo insulínico (figura 3A). Apesar da expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias não ter sido avaliada após as oito semanas de exposição à dieta, podemos observar uma relação inversa entre o aumento do peso corporal e a diminuição da

sensibilidade à insulina, o que sugere dizer que o incremento do peso corporal devido a um grande aumento na quantidade de tecido adiposo (Tabela 1), foi suficiente para reduzir a sensibilidade à insulina periféricamente.

Sabe-se, no entanto que a prática de exercício físico possui efeito lipolítico, reduzindo o acúmulo de tecido adiposo e citocinas pró-inflamatórias além de atuar na manutenção da homeostasia glicídica, potencializando a sinalização da insulina [12,17]. Novos estudos apresentam resultados promissores e sugerem que o exercício físico executado de forma mais intensa possa atuar como medida eficaz e não farmacológica para o tratamento de doenças crônico-degenerativas [18].

Diante disso, vários protocolos de treinamento que modulam a intensidade e tempo de esforço vêm sendo desenvolvidos na tentativa de estabelecer a melhor dose-resposta para amenizar ou reverter patologias causadas pelo estilo de vida sedentário e maus hábitos alimentares [19,20,21].

No presente estudo, dois protocolos de exercício desenvolvidos em intensidades diferentes foram avaliados. Para que não houvesse diferença na quantidade final de trabalho executado, utilizamos a equação adaptada de Lira (2010) para equipararmos as cargas de esforço, desta maneira mesmo treinando em intensidades diferentes o trabalho total (verificado através da caracterização do treinamento) durante cada sessão de treinamento foi semelhante (figura 1A e 1B).

A literatura atual aponta o treinamento intervalado como sendo igual ou até mais eficiente para a redução do peso corporal, manutenção e/ou aumento da capacidade aeróbia [21] e redução de fatores de risco para doenças crônico-degenerativas[18] quando comparado ao treinamento contínuo de

intensidade moderada. Segundo Gibala e colaboradores (2009) [22] quando o treinamento intervalado é executado de maneira intensa pode provocar aumento na atividade de enzimas mitocondriais, melhora a performance durante atividades que dependem do metabolismo aeróbio, além de aumentar o conteúdo de proteínas associadas ao transporte e oxidação de glicose e ácidos graxos.

Ao avaliarmos o incremento de peso corporal durante as oito semanas de exercício (figura 2B) e o perfil morfométrico dos animais (Tabela 1), observa-se que os grupos controle sedentário e obeso sedentário (CS e OS) continuaram aumentando o peso corporal até o dia do sacrifício. Vale ressaltar que o aumento no peso corporal dos animais do grupo OS ocorreu essencialmente devido ao aumento da quantidade de tecido adiposo.

Por outro lado, o incremento do peso corporal dos grupos CEC, CEI, OEC e OEI foi retardado e as quantidades de tecido adiposo foram reduzidas, após oito semanas de treinamento. Outro aspecto interessante a destacar é que após as oito semanas de treino os grupos exercitados apresentaram aumento na sensibilidade de maneira semelhante (figura 3B).

Além da manutenção do peso corporal e aumento da sensibilidade à insulina e captação de glicose, o exercício físico é capaz de melhorar a capacidade aeróbia, todavia, a magnitude desse efeito benéfico sobre o metabolismo oxidativo é dependente da intensidade de esforço [23]. O aumento do gasto energético diminui a taxa de ATP intracelular, ativa a via da AMPK que por sua vez é capaz de modular a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) [24] e biogênese mitocondrial por estimular a atividade do

Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α) [25].

Quando a capacidade aeróbia é avaliada através do teste de duplos esforços (tabela 2) nota-se que, tanto os animais do grupo controle quanto os animais do grupo obeso, de ambos os protocolos de treinamento, aumentaram o limiar anaeróbio.

É sabido que o gene promotor do GLUT4 possui domínio específico para a ligação dos seus fatores transcripcionais, entre eles o Myocyte Enhancer Factor 2D (MEF2D) e PGC1 α [27]. O primeiro fator está presente no núcleo celular inibido por um dos membros da família das histonas Deacetilases, a Histona Deacetilases classe V (HDAC5) [28]. No entanto, a contração muscular estimula a atividade da AMPK que por sua vez fosforila e desfaz a ligação entre o MEF2D e a HDAC5, permitindo a ligação do MEF2D no sítio específico do gene promotor do GLUT4 [28].

Além da AMPK, o PGC1 α também colabora no processo de síntese de mRNA de GLUT4 [27]. Ao ser estimulado ele desempenha diversas funções, uma delas é a de se ligar em um sítio específico localizado no gene promotor do GLUT4. Ambos eventos biológicos são fatores determinantes para o aumento da expressão de glut4 através da contração muscular.

Assim, nossos resultados sugerem que ambos os protocolos de treinamento, mesmo em intensidade diferentes, conseguem estimular a mesma via metabólica causando adaptações semelhantes. O treinamento contínuo bem como o intervalado, foram capazes de aumentar a velocidade de limiar de todos os animais exercitados, além de potencializar a expressão e atividade da

AMPK do mesmo modo que também aumentou a síntese de mRNA do PGC1 α e do GLUT4.

Outra implicação benéfica do exercício físico é o efeito lipolítico, capaz de reduzir o tecido adiposo [5] e marcadores inflamatórios. As citocinas quando liberadas na corrente sanguínea se ligam a receptores de membrana específico e desencadeiam uma cascata metabólica conhecida com JAK/STAT que induz a síntese da SOCS3 inibindo a atividade do receptor de citocinas e do receptor de insulina [3,4].

Em nosso estudo os animais obesos sedentário apresentaram maiores quantidades de tecido adiposo (tabela 1), menor capacidade de captação de glicose (figura 3A) e significativo aumento na expressão da SOCS3 (figura 5D), sugerindo a possível relação entre o consumo de comidas gordurosas, aumento do tecido adiposo e instalação da resistência à insulina através do aumento de marcadores inflamatórios.

No entanto, após oito semanas de treinamento, todos os animais exercitados apresentaram valores significativamente reduzidos. Vale ressaltar que mesmo ingerindo a dieta hiperlipídica durante as semanas de treinamento, os animais do grupo OEC e OEI reduziram a expressão de mRNA da SOCS3 chegando a valores semelhantes aos dos grupos CEC e CEI.

Conclui-se que os animais sedentários e expostos à dieta hiperlipídica apresentaram expressivo ganho de peso corporal, aumento na quantidade de tecido adiposo branco, redução na sensibilidade à insulina e aumento de marcador inflamatório. Contudo, após oito semanas de ambos os protocolos de treino tanto o peso corporal quanto as quantidades de tecido adiposo foram reduzidas e a sensibilidade à insulina foi aumentada. Oito semanas de

treinamento contínuo ou intervalado foram suficientes para aumentarem a capacidade aeróbia dos animais exercitados a expressão gênica de proteínas envolvidas tanto no metabolismo da glicose quanto da biogênese mitocondrial.

Referência

1. Seraphim, P.M., Nunes, M.T., Machado, U.F. GLUT4 protein expression. in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Braz J Med Biol Res* 2001;**34**:1353-62.
2. Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., et al. TNF-alpha downregulates iNOS expression and mitochondria biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest* 2006; **116**:2791-8.
3. Alexander, W.S., Hilton, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Ann Rev Immunol* 2004; **22**:503-29.
4. Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., Van Obberghen, E. SOCS3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000;**275**:15985-91.
5. Yaspelkiis, B.B., Kvasha, I.A., Lessard, S.J., Rivas, D. A., Hawley, J.A. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory. *Eur J Appl Physiol* 2010;**110**:779-88.
6. O'Gorman, D.J., Krook A. Exercise and the Treatment of Diabetes and Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;**37**:887-903.
7. Junior, T.G., Schutz, H., Chappell, M.A., Keeney, B.K., Meek, T.H., Copes, L.E., Acosta, W., Drenowatz, C., Maciel, R.C., Dijk, G.V., Kotz, C.M. Eisenmann, J.C. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *The Journal of experimental Biology* 2011; **214**: 206-229.
8. Hardie, D.G. e Sakamoto K. AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle." *Physiology* 2005; **21**: 48–60.
9. MacLEAN, P.S., Zheng D., Jones J.P., Olson A.L., Dohm G.L. Exercise-Induced Transcription of the Muscle Glucose Transporter (GLUT 4) Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; **292**:409–414.
10. Miyamoto, L., Toyoda, T., Hayashi, T., et. al. Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; **102**:1007-1013.
11. Panveloski, A.C., Pinto Junior, D.A.C., Brandão, B.B., Moreira, R.J., Seraphim, P.M. Treinamento resistido reduz a inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos

induzidos por dieta hiperlipídica. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 2011; **55**:155-163.

- 12 Pádua, M.F., Pádua, T.F., Pauli, J.R., De Souza, C.T., Da Silva, A.S.R., Ropelle, E.C.C., Cintra, D.E., Carnevali, J.B.C., Ropelle, E.R. Exercício físico reduz a hiperglicemia de jejum em camundongos diabéticos através da ativação da AMPK. Rev Bras Med Esporte 2009;**15**:179-184.
- 13 Manchado-Gobatto, F.B., Gobatto, C.A., Contarteze, R.V.L., Mello, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in running rats. Indian J. Exp. Biol 2011; **49**:781-785.
- 14 Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Voltarelli, F.A., Mello, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. Appl. Physiol. Nutr. Metab 2006; **31**: 731-736.
- 15 Lira, F.S., Rosa, J.C., Pimentel, G.D., Tarini, V.A.F., Arida, R.M., Faloppa, F. et. al. Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. Lipids in Health and Disease 2010;**9**:2-10.
- 16 Tilg, H., Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2006;**6**:772-83.
- 17 Hopps, E. e Caimi, G. Exercise in Obesity Management. J Sports Med Phys Fitness 2011;**51**:275-282.
- 18 Tjønnå, A.E., Lee, S.J., Rognmo, O., Stølen, T.O., Bye, A., Haram, P.M., Løkken, J.P. et. al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome: A Pilot Study. Circulation 2008;**118**:346-354.
- 19 Gibala, M.J., McGee, S.L., Garnham, A.P., Howlett, K.F., Snow, R.J. and Hargreaves, M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. J Appl Physiol 2009;**106**:929-934.
- 20 Guelfi, K. J., Ratnam, N., Smythe, G.A., Jones, T.W., Fournier, P.A. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes. AJP – Endo 2007; **292**: E865-E870.
- 21 Guimarães, G.V., Ciolac, E.G., Carvalho, O., D'Ávila, V.M., Bortolotto, and Bocchi, E.A. Effects of continuous vs. interval exercise training on blood pressure and arterial stiffness in treated hypertension. Hypertension Research 2010;**33**:627-632.

- 22 Gibala, M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;**34**:428–432.
- 23 Chen, Z.P., Stephens, T.J., Murthy, S., Canny, B.J., Hargreaves, M., Witters, L.A., Kemp, B.E. and McConell, G. Effect of Exercise Intensity on Skeletal Muscle AMPK Signaling in Humans. *Diabetes* 2003;**52**:2205-2212.
- 24 Ojuka, E.O., Jones, T.E., Nolte, L.A., Chen, M., Wamhoff, B.R., Sturek, M., Holloszy, J.O. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca^{2+} . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;**282**: E1008–E1013.
- 25 Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;**47**:69-84.
- 26 S. Soyak . F. Krempler . H. Oberkofler . W. Patsch. PGC-1 α : a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;**49**:1477-1488.
- 27 Beton, C.R., Wright, D.C. and Bonen, A. PGC-1- α -mediated regulation of genes expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;**33**:843-862.
- 28 McGee, S.L., Van Denderen, B.J.W., Howlett, K.F., Mollica, J., Schertzer, J.D., Kemp, B.E. and Hargreaves, M. AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. *Diabetes* 2008;**57**:860-867.
- 29 Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;**17**:4-12.

TABELAS

Tabela 1 – Valores morfométrico dos animais no dia do sacrifício

GRUPOS	PESO CORPORAL (g)	PESO TECIDO ADIPOSEO (g)
CS	478,8 ± 4,33	6,55±0,70
OS	577,5 ± 16,89*	14,11±0,85*
CEC	417,6 ± 16,06*	4,83±0,34*
OEC	477,5 ± 14,21 ^{\$&}	7,53±0,93 ^{\$&}
CEI	430,2 ± 26,20*	4,11±0,34*
OEI	482,6 ± 12,62 ^{\$#}	8,58±0,71 ^{\$#}

Tabela 2 – Valores de velocidade referente ao limiar anaeróbio

Grupos	Teste	Velocidade de Limiar (m.min ⁻¹)	<i>P</i>	Δ Limiar
CEC	T1 vs T2	15,54 ± 1,61 vs 18,48 ± 0,92	0,218	2,94
OEC	T1 vs T2	14,20 ± 0,78 vs 18,11 ± 0,63	0,002	3,91
CEI	T1 vs T2	12,38 ± 0,68 vs 15,23 ± 0,44	0,011	2,85
OEI	T1 vs T2	13,65 ± 0,72 vs 17,25 ± 0,72	0,009	3,6

FIGURAS

Figura 1

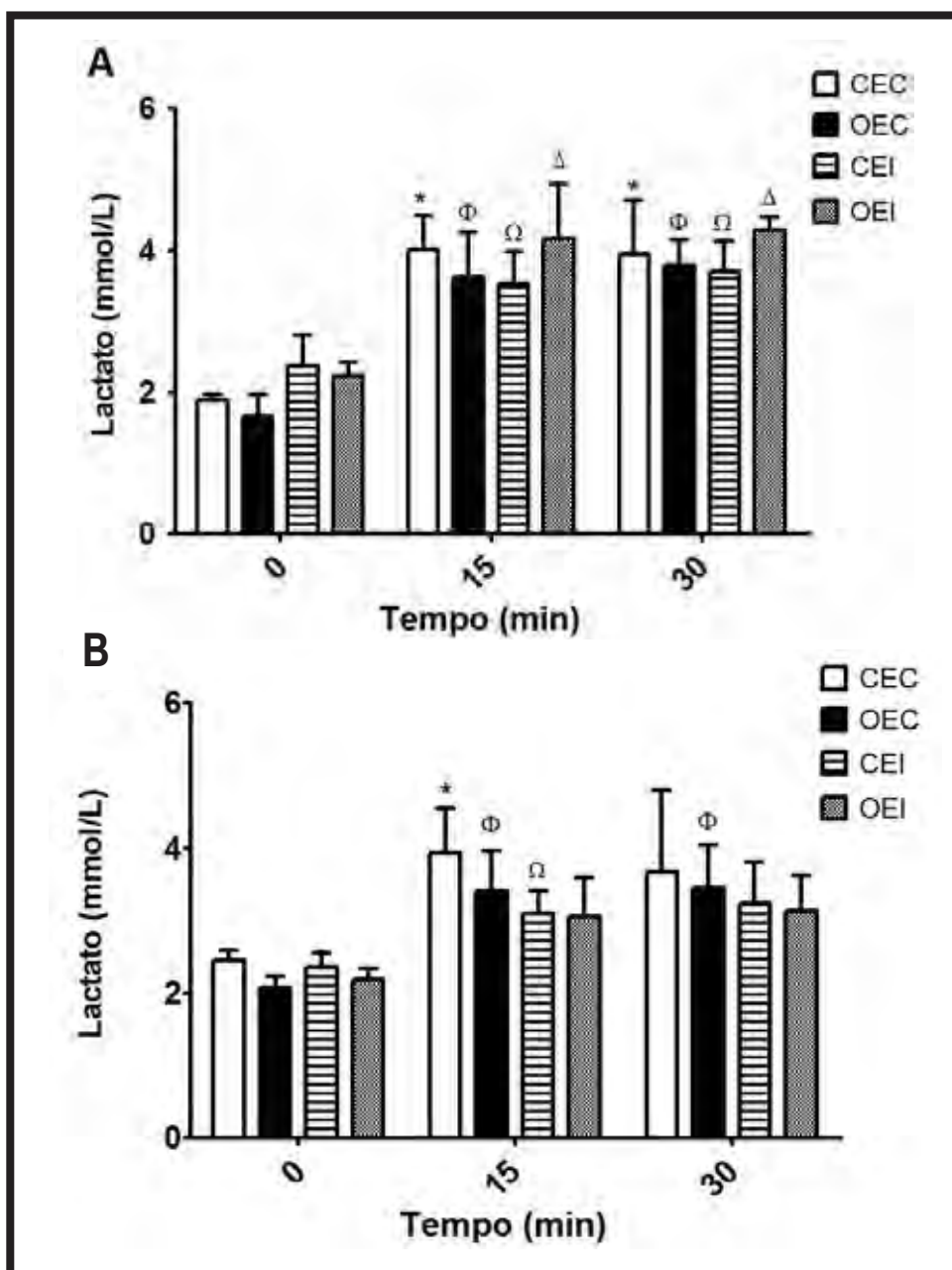


Figura 2

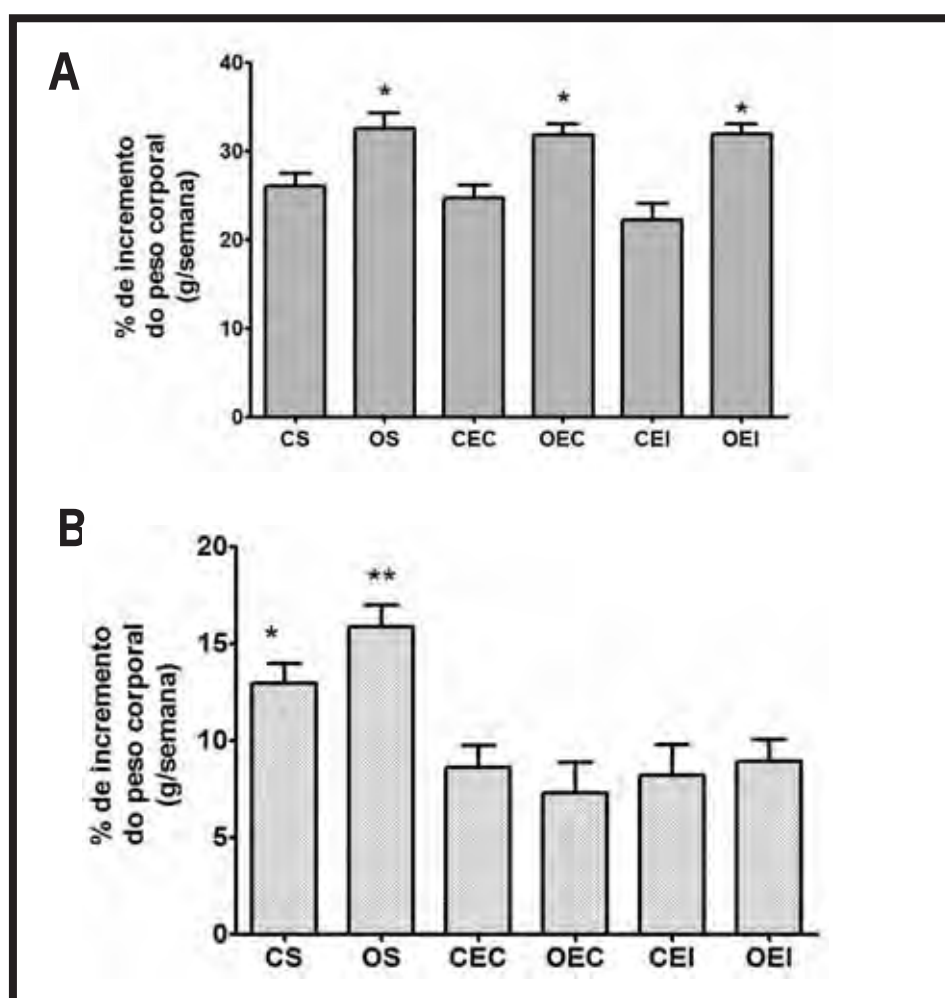


Figura 3

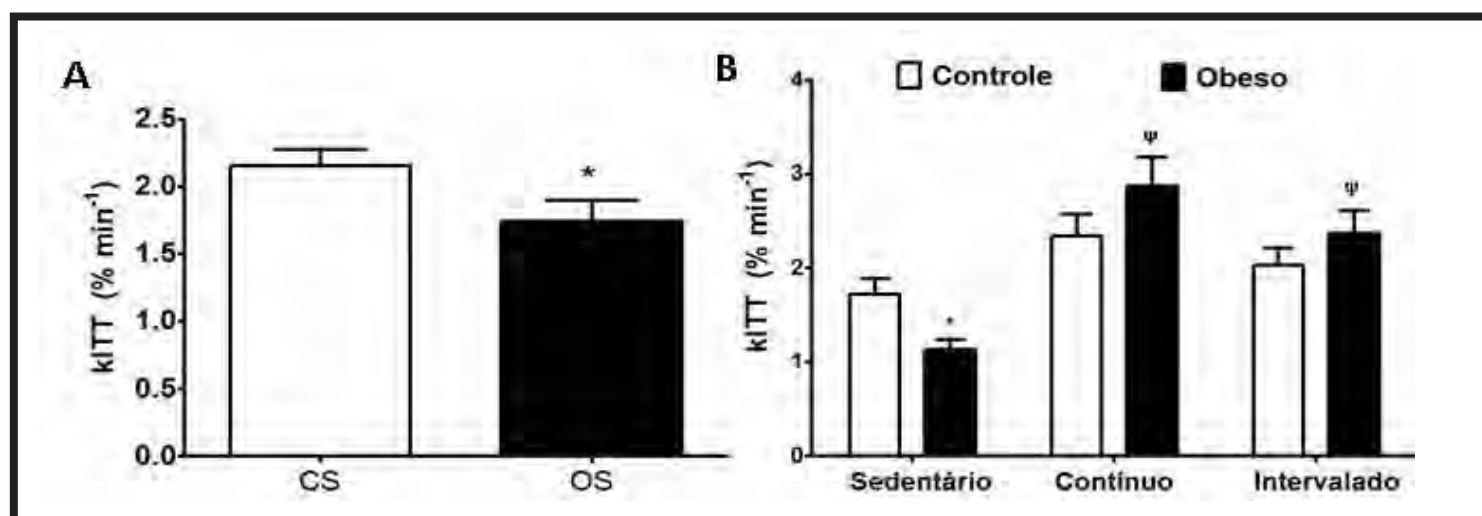


Figura 4

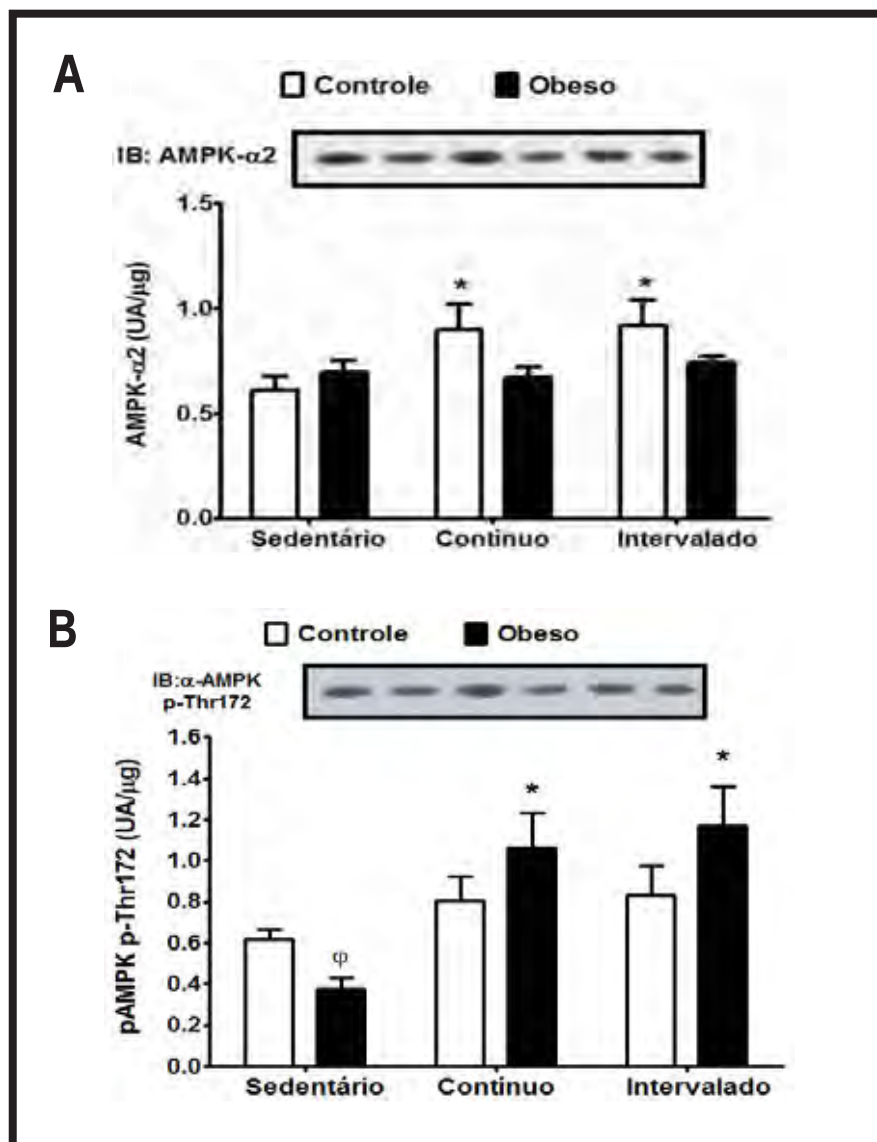
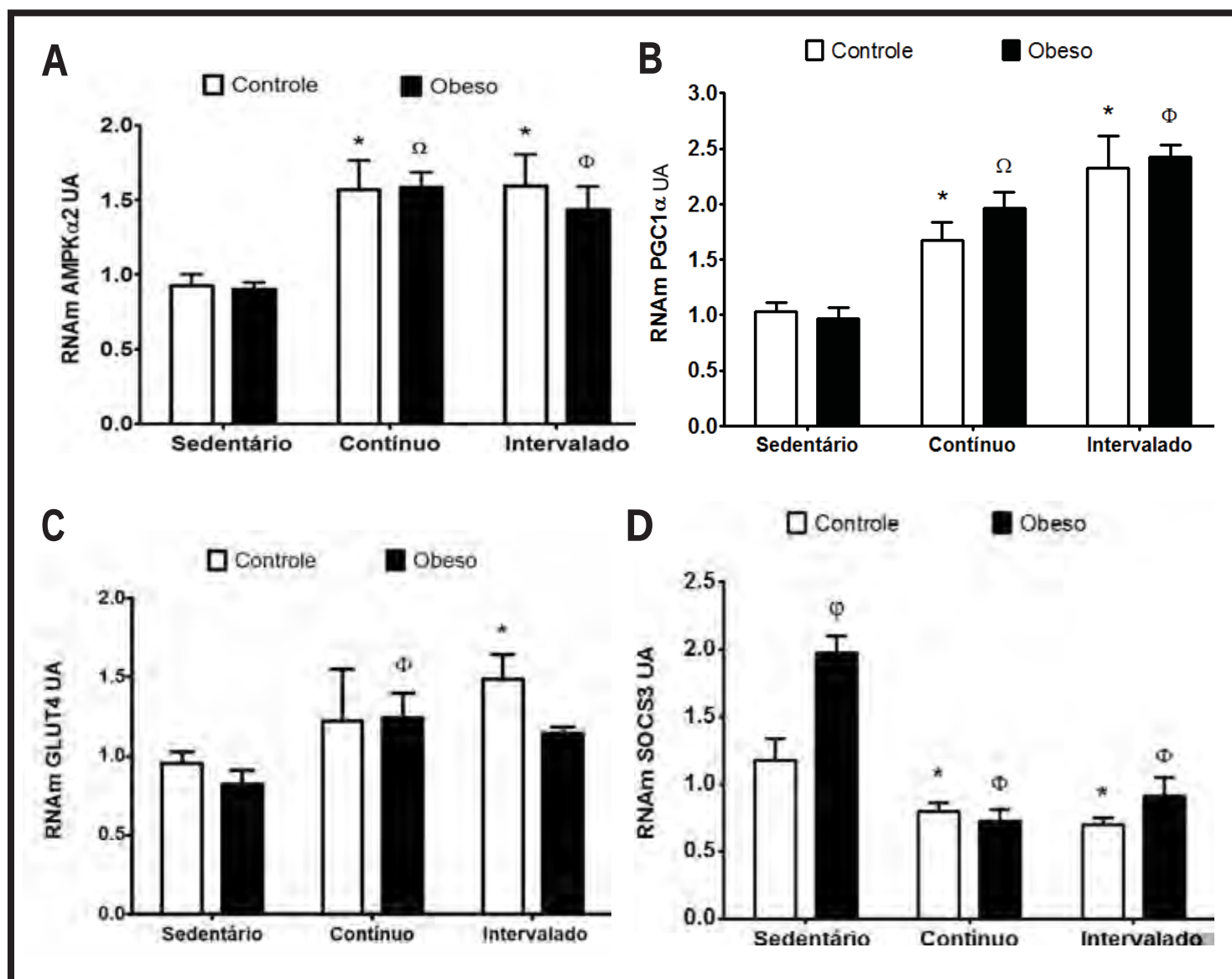


Figura 5



LEGENDAS DAS TABELAS

Tabela1 : Peso corporal * $P < 0,01$ vs CS; \$ $P < 0,01$ vs OS; & $P < 0,05$ vs CEC; # $P < 0,05$ vs CEI. Tecido Adiposo: * $P < 0,05$ vs CS; \$ $P < 0,001$ vs OS; & $P < 0,001$ vs CEC; # $P < 0,001$ vs CEI (n = 7) Grupos Experimentais: Controle Sedentário (CS); Controle Exercício Contínuo (CEC); Controle Exercício Intervalado (CEI); Obeso Sedentário (OS); Obeso Exercício Contínuo (OEC) e Obeso Exercício Intervalado (OEI).

Tabela 2 - T1: Foi feito após oito semanas de dieta para determinar a velocidade inicial de treinamento. T2: Foi feito após oito semanas de treinamento, antes da eutanásia. Os Valores de P foram determinados pelo teste t pareado.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1 – Caracterização do treino. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. **A.** Caracterização da segunda semana de treino. * $P < 0.01$ vs CEC T-0; $\Phi P < 0.01$ vs OEC T-0. $\Omega P < 0.01$ vs CEI T-0 e $\Delta P < 0.01$ vs OEI T-0; **B** Caracterização da segunda semana de treino. * $P < 0.01$ vs CEC T-0; $\Phi P < 0.05$ vs OEC T-0 e $\Omega P < 0.05$ vs CEI, (n=6).

Fig. 2 – Regressão linear do peso corpóreo: Incremento do peso corporal (g/semana) em animais controles e obesos. Todos os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. **Em A.** Valor do coeficiente angular ao longo de oito semanas de dieta hiperlipídica. * $P < 0.001$ vs CS, CEC e CEI, (n=6). **B.** Valor do coeficiente angular ao longo de oito semanas de treino. *** $P < 0.001$ vs CEC, OEC, CEI e OEI; \$ $P < 0.01$ vs SC; * $P < 0.05$ vs CEI, (n=6).

Fig. 3 – Constante de decaimento da glicose por minuto (kITT). Todos os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. **A.** kITT em oito semanas de dieta. * $P < 0.05$ vs SC. **B.** kITT após oito semanas de treinamento. * $P < 0.01$ vs SC; $\Psi P < 0.01$ vs OS, (n=6).

Fig. 4 – Conteúdo Proteico de AMPK α 2 e fosforilação da AMPK α 2. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM e corrigidos pela expressão de GAPDH. **A.** Conteúdo de Proteína AMPK α 2. * $P < 0.05$ vs SC. **B.** Fosforilação da AMPK α 2. * $P < 0.01$ vs SO; $^{\Phi}P < 0.05$ vs SC, (n=6).

Fig. 5 – Expressão gênica de AMPK α 2, PGC1 α , GLUT4 e SOCS3.

Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM e corrigidos pela expressão de GAPDH. **A.** Conteúdo de mRNA de AMPK α 2. * $P < 0.01$ vs SC; $^{\Omega}P < 0.01$ vs SO; $^{\Phi}P < 0.05$ vs SO. **B.** Conteúdo de mRNA de PGC1 α . * $P < 0.05$ vs SC; $^{\Omega}P < 0.05$ vs SO; $^{\Phi}P < 0.01$ vs SO; **C.** Conteúdo de mRNA de GLUT4. * $P < 0.05$ vs SO; $^{\Phi}P < 0.01$ vs SO. **D.** Conteúdo de mRNA de SOCS3. * $P < 0.05$ vs SC; $^{\Phi}P < 0.01$ vs SC; $^{\Phi}P < 0.01$ vs SO, (n=6).

Referência

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>: acesso de 18 de outubro de 2011
2. Ferreira VA.; Magalhães R. Obesidade no Brasil: tendências atuais. Revista Portuguesa de Saúde Pública, 2008; 24: 71-78.
3. Sarturi JB et al. Obesidade em adultos: estudo de base populacional num município de pequeno porte no Sul do Brasil em 2005. Ciência & Saúde Coletiva, 2010; 15: 105-113.
4. Kershaw EE. and Flier JS. Adipose tissue as endocrine organ, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004; 89: 2548-2556
5. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. Am J Clin Nutr, 1987; 45: 277–282.
6. Flier JS, Cook KS, Usher, P, Spiegelman BM. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. Science, 1987; 237: 405–408.
7. Masharani UB, Maddux,BA, , Li X, Sakka GK, et. al. Insulin Resistance in Non-Obese Subjects Is Associated with Activation of the JNK Pathway and Impaired Insulin Signaling in Skeletal Muscle. PlosOne, 2011; 6.
8. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. Ann Rev Immunol. 2004; 22:503-29.
9. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. J Biol Chem. 2000; 275:15985-91.
10. Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein expression. in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. Braz J Med Biol Res. 2001; 34:1353-62.
11. MacLEAN, PS, et. al. Exercise-Induced Transcription of the Muscle Glucose Transporter (GLUT 4) Gene. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002; 292:409–414.
12. Maratos-Flier E, e Flier JS. Obesidade, Cáp. 31 em Joslin Diabetes Mellito, tradução: Alexandre Lins Werneck, Ane Rose Bolner e Paulo Henrique Machado, 2009; 545-547.

13. Pimenta AS et al. Prolonged Exposure to Palmitate Impairs Fatty Acid Oxidation Despite Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal. *J. Cell. Physiol*, 2008; 217: 478–485.
14. Steinberg GR. Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, 2009; 34:315–322.
15. Miyamoto L, Toyoda T, Hayashi T, et. al. Effect of acute activation of 5_ - AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2007; 102:1007-1013.
16. Hardie DG., e Sakamoto K. AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle.” *Physiology*, 2005; 21: 48–60.
17. MacLEAN, PS. et. al. Exercise-Induced Transcription of the Muscle Glucose Transporter (GLUT 4) Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002; 292:409–414.
18. Guelfi K.J et. al. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 292:E865-E870.
19. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *Journal of Applied Physiology*, 1993; 75:712-9.
20. McKay BR, Paterson DH and Kowalchuk JM. Effect of short-term high-intensity interval training vs. continuous training on O₂ uptake kinetics, muscle deoxygenation, and exercise performance *J Appl Physiol*, 2009; 107:128–138.
21. Gibala M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, 2009; 34:428–432.
22. Richter EA. and Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J*. 2009; 418:261-275.
23. Rose AJ. and RICHTER EA. Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulate? *Physiology*, 2005; 20:260-270.
24. Tjønnå AE., et. al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome: A Pilot Study. *Circulation, Journal of the American Heart Association*.

25. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1-6.
26. Manchado FB, Gobatto CA, Voltarelli FA, Mello MAR. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab* 2006; 31: 731-736.
27. Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol* 1973; 35: 236-245.
28. Brooks GA. Current concepts in lactate exchange. *Med Sci Sports Exerc* 1985; 23: 895-906.
29. Baron B, Noakes TD, Deckerle J, Moullan F, Robin S, Matran R, et. al. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? *Br. J. Sports Med* 2008; 42: 828-833.
30. Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Mello MAR. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in running rats. *Indian J. Exp. Biol*, 2011; 49: 781-785.