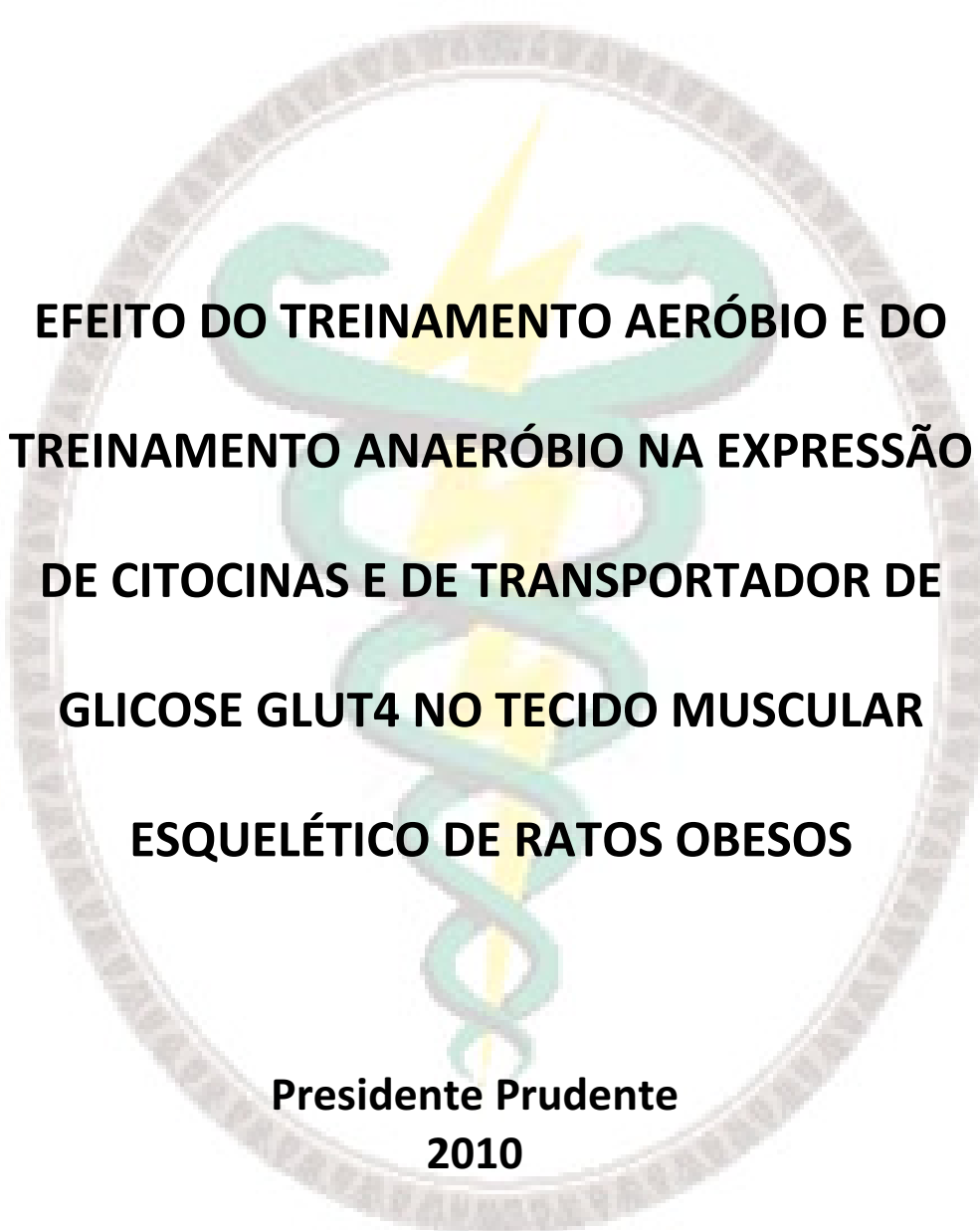


Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia



EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO E DO TREINAMENTO ANAERÓBIO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DE TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT4 NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS OBESOS

**Presidente Prudente
2010**

Ana Carolina Panveloski Costa

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO E DO
TREINAMENTO ANAERÓBIO NA EXPRESSÃO DE
CITOCINAS E DE TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT4
NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DE RATOS OBESOS**

A large, faint, light blue geometric logo, similar to the UNESP logo, is positioned in the background behind the text.

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP, campus de
Presidente Prudente, para obtenção do título
de Mestre no programa de Pós graduação em
Fisioterapia**

**Orientador: Profa. Dra. Patricia Monteiro
Seraphim**

**Presidente Prudente
2010**

Costa, Ana Carolina Panveloski..
C87e Efeito do Treinamento Aeróbio e do Treinamento Anaeróbio na
Expressão de Citocinas e de Transportador de Glicose GLUT4 no
Tecido Muscular Esquelético de Ratos Obesos / Ana Carolina
Panveloski Costa. - Presidente Prudente, 2010
135 f.

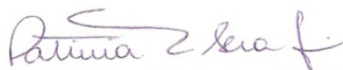
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Orientador: Patricia Monteiro Seraphim
Banca: Marcelo Papoti, Solange Marta Franzói de Moraes
Inclui bibliografia

1. Fisioterapia. 2. Obesidade. 3. Treinamento Aeróbio. 4.
Treinamento Anaeróbio. I. Autor. II. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

CDD 615.8

**Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Presidente Prudente.**

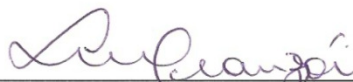
BANCA EXAMINADORA



PROFA. DRA. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM
(ORIENTADOR)



PROF. DR. MARCELO PAPOTI
(FCT/UNESP)



PROFA. DRA. SOLANGE MARTA FRANZOI DE MORAES
(UEM)



ANA CAROLINA PANVELOSKI COSTA

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 02 DE DEZEMBRO DE 2010.

RESULTADO: Aprovada

Dedicação

*Dedico o resultado de uma breve, porém, árdua missão de me tornar mestre à
minha família e ao meu namorado que a todo momento me dão suporte
emocional e, à minha orientadora que acreditou em meu potencial e sempre
incentivou a expansão do conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me guiou nessa caminhada para que eu conseguisse enxergar em cada dificuldade o crescimento.

À minha orientadora que depositou sua confiança em mim desde o primeiro dia em que estive no seu laboratório e então me incentivou a fazer jus ao título de mestre.

À minha família que desde a minha graduação me deu total apoio nos estudos e me mostraram que viver à distância é apenas uma das maneiras de conhecermos a si próprio e fazer valer todos os valores adquiridos durante a formação pessoal.

Ào meu namorado que cruzou meu caminho durante minha formação profissional e, que com certeza foi em muitos momentos minha maior motivação de seguir em frente a caminho dos meus sonhos.

Àos amigos que acompanharam muitos momentos de alegria ou de angústia, mas que geravam motivação para pensar que a vida vale a pena. Em especial

aos que repartiram parte de sua vida convivendo dia-a-dia comigo, Mayra e Alessandra.

Às professoras Roselene Modolo e Eliane Ferreira que me ensinaram que o sucesso de todo trabalho está, sobretudo, na satisfação em fazê-lo com amor e dedicação.

Ào professor Marcelo Papoti que não hesitou em contribuir na expansão do meu projeto e compartilhou comigo parte do seu grande conhecimento.

Àos colegas de trabalho Rafael, Patricia, Danilo, Bruna, Leidiane e Lidiane por muitos momentos de trabalho e de descontração.

Àos professores Luis Carlos e José Carlos por terem colaborado na execução do projeto possibilitando o uso do biotério.

Ào técnico do laboratório de Histoquímica, Sidney, por estar sempre de prontidão em todos momentos que precisei.

Sumário

Lista de Abreviaturas	12
Apresentação	14
Introdução.....	17
Artigo I: “O treinamento aeróbio de baixa intensidade melhora o quadro inflamatório muscular e a sensibilidade à insulina em ratos obesos”.....	22
Artigo II “Respostas lactacidêmicas provenientes e sessões agudas e crônicas de treinamento intermitente de alta intensidade (jump squat) em ratos Wistar”.....	53
Artigo III “O exercício físico resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos por dieta hiperlipídica”.....	87
Conclusões.....	117
Referências.....	119
Anexos.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK – proteína cinase ativada por AMP

GLUT4 – proteína transportadora de glicose 4

I κ B – inibidor do fator nuclear Kappa B

IKK β - subunidade catalítica β da proteína cinase I κ B

IL-1 β - interleucina-1 β

IL-6 – interleucina 6

ITT – teste de tolerância à insulina

IRS-1 – substrato do receptor de insulina 1

JNK – cinase c-Jun N-terminal

[La] - lactato

MAPK p38 - proteína cinase ativada por mitógeno p-38

NF κ B - fator nuclear Kappa B

PC – Peso Corpóreo

PCr - fosfatocreatina

PGC1- α – coativador-1 alfa do receptor proliferador-ativador de peroxissomos

PI3-k - fosfatidil-inositol-3-cinase

PkB - proteína cinase B

PkC - proteína cinase C

SOCS3 – proteína supressora da sinalização de citocinas tipo 3

STAT – proteína de ativação da transcrição e de transdução de sinalização

TAG – triglicerídeos

TGIM – triglicérides intra-musculares

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

Este modelo alternativo de dissertação contempla o material originado a partir da pesquisa intitulada **“Efeito do treinamento aeróbio e do treinamento anaeróbio na expressão de citocinas e de transportador de glicose GLUT4 no tecido muscular esquelético de ratos obesos”**, realizada no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPFis, da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente.

Em consonância com as regras do programa de pós graduação em Fisioterapia desta unidade, o presente material está dividido nas seguintes sessões:

- *Introdução*, para contextualização do tema pesquisado;
- *Artigo I*: Panveloski-Costa AC, Brandão BB, Pinto Junior DAC, Papoti M, Seraphim PM. “O treinamento aeróbio de baixa intensidade melhora o quadro inflamatório muscular e a sensibilidade à insulina em ratos obesos” a ser submetido no periódico Revista Brasileira de Medicina do Esporte.
- *Artigo II*: Panveloski-Costa AC, Papoti M, Moreira RJ, Seraphim PM. “Respostas lactacidêmicas provenientes de sessões agudas e crônicas de treinamento intermitente de alta intensidade (jump squat) em ratos Wistar” a ser submetido no periódico Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.
- *Artigo III*: Panveloski-Costa AC, Pinto Junior DAC, Brandão BB, Seraphim PM. “O exercício físico resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos por dieta hiperlipídica”. Submetido no periódico Revista Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo – 2 de setembro de 2009.

- *Conclusões*, obtidas a partir da pesquisa realizada; e
- *Referências*, cujo formato é recomendado pelo comitê internacional de editores de jornais médicos (ICMJE – *International committee of medical journals editours*), para apresentação das fontes utilizadas na redação da introdução.
- Ressalta-se ainda que cada artigo está apresentado de acordo com as normas dos respectivos periódicos , em anexo ao final.

Os ácidos graxos e a glicose constituem os combustíveis oxidativos primários que suportam a atividade contrátil muscular. Sob padrões fisiológicos normais, este tecido possui grande potencial de ajuste de seleção de combustíveis de acordo com a oferta e a demanda energética e, a insulina, é o principal hormônio regulador dessas transições (1).

Elevados níveis de insulina em estado pós-prandial favorecem a captação de glicose e o metabolismo glicolítico, enquanto que baixos níveis de insulina e elevados de ácidos graxos durante algumas circunstâncias, como o jejum e exercício aeróbio, disparam programas metabólicos que promovem a β -oxidação (2).

No entanto, diversos estudos têm mostrado que resistência à insulina tem correlação positiva com o acúmulo anormal de triglicerídeos (TAG) em tecidos ectópicos como o músculo esquelético (3, 4).

O transporte de glicose estimulado pela insulina em células adiposas e musculares se inicia pela autofosforilação do receptor de insulina em tirosina, seguido por fosforilação/ativação de várias proteínas intracelulares tais como substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) (2), o qual também deve ser fosforilado em tirosina para ser ativado e ativar outras proteínas citoplasmáticas, tais como fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3k), proteína cinase B (Pkb), culminando na translocação de proteína transportadora de glicose GLUT4 para a membrana plasmática, o que aumenta bastante a captação de glicose (5).

Os eventos metabólicos que associam a exposição crônica de dietas hiperlipídica aos prejuízos na sinalização da insulina promovidos por serinas cinases, tais como, a proteína cinase C (PKC), a proteína cinase ativada por

mitógeno p-38 (MAPK p-38), subunidade catalítica β da proteína cinase I κ B (IKK-b) e cinase c-Jun N-terminal (JNK) (6), ainda não são precisos. Mas uma teoria sugere que a resistência à insulina decorre de prejuízos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, e conseqüente acúmulo de metabólitos de lipídeos que ativam algumas cinases como a PKC e a JNK (7,8). Essas cinases, por sua vez, promovem transcrição de citocinas com efeitos pró-inflamatórios tal como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (6).

As vias intracelulares ativadas pelo fator de necrose tumoral - α (TNF- α) e outras citocinas que interagem com a sinalização da insulina precisam ser mais bem elucidadas. No entanto, estudos propõem que um dos mecanismos pelo qual o TNF- α pode contribuir para resistência insulínica é através da elevação dos níveis circulantes de ácidos graxos livres, causado pela indução da lipólise e estimulação da lipogênese hepática (9).

Curiosamente tem sido sugerida a participação do TNF- α na resistência à insulina na obesidade, com indução da expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas tipo 3 (SOCS-3) principalmente em tecido adiposo branco (10). Finalmente, em ratos obesos foi observada uma pronunciada redução na expressão da SOCS-3 no tecido adiposo branco transgênico desprovido da sinalização do TNF- α . Esse estudo mostra que o TNF- α , uma molécula conhecida por estar envolvida na resistência à insulina em ratos obesos, é responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão do SOCS-3 (10).

Embora a SOCS seja uma proteína originalmente pertencente à via de sinalização de citocinas, foi mostrado recentemente que ela também pertence ao circuito de sinalização da insulina (11). Quando expressa, a SOCS-3

localiza-se no citoplasma em condições basais. Após o tratamento com insulina, foi observado seu deslocamento para a membrana plasmática, onde pode interagir com o receptor da insulina, regulando negativamente a ação da insulina (11).

Como no jejum, o exercício submáximo provoca um aumento transitório da absorção e do catabolismo de ácidos graxos e, como na obesidade, o exercício físico crônico promove aumento do conteúdo de triglicérides intramusculares (TGIM) (12).

No entanto, estudos sugerem que o exercício físico aumenta a tolerância a grandes quantidades de lipídeos. Tal fato decorre dos ajustes metabólicos oxidativos em resposta ao exercício, os quais ocorrem associados ao aumento do conteúdo e da função mitocondrial e, ativação do coativador-1 alfa do receptor proliferador-ativador de peroxissomos (PGC1- α), proteína envolvida na biogênese mitocondrial (13, 14).

Estudos em animais (15) têm mostrado que estimulação elétrica em músculos isolados com pulsos de baixa frequência por períodos prolongados (mimetizando treinamento aeróbio) ou de alta frequência por curtos períodos (mimetizando treinamento anaeróbio) ativa seletivamente cascatas de sinalização associadas à biogênese mitocondrial (Proteína Cinase ativada por AMP - AMPK) (16).

A maioria dos relatos dos efeitos do exercício na modulação de citocinas são provenientes de estudos envolvendo treinamento aeróbio (17-20). Em contraste, as provas sobre a relação entre exercício resistido e inflamação é mais limitada (21). As respostas fisiológicas e o padrão de citocinas liberadas

pelo músculo frente ao exercício aeróbio são diferentes dos obtidos em exercício resistido (22).

Já estão bem estabelecidos na literatura, os efeitos adaptativos benéficos do treinamento aeróbio em relação à melhora da capacidade oxidativa mitocondrial e, conseqüentemente da otimização da utilização dos substratos energéticos para fornecimento de energia (23). No entanto, estudos dos efeitos de treinamento realizados com predomínio do sistema glicolítico na função oxidativa da célula muscular ainda precisam ser melhor elucidados.

Cronicamente elevados níveis de interleucina-6 (IL-6) têm sido associadas com resistência à insulina e obesidade. Paradoxalmente, a IL-6 aumentou várias vezes após o exercício, no mesmo período, houve melhora da ação da insulina (24). Uma proposta relação entre a IL-6 e a insulina, é que a IL-6 ativa a SOCS no fígado e inibe o IRS, o que pode resultar em resistência à insulina (25). No entanto, a ativação da SOCS pela IL-6 liberada no tecido muscular não é tão potente. Além disso, em apoio ao papel benéfico da IL-6 no metabolismo da glicose, Pedersen et al. (2007) propôs que a IL-6 derivada do músculo ativa a proteína cinase dependente de AMP (AMPK) não causando ativação da SOCS (26).

Portanto, a partir das inferências acima, hipotetizou-se que o treinamento anaeróbio, assim como o treinamento aeróbio, poderia ser um bom modulador de proteínas cinases envolvidas na resistência à insulina tendo efeitos sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a SOCS3.

**O TREINAMENTO AERÓBIO DE BAIXA INTENSIDADE MELHORA O
QUADRO INFLAMATÓRIO MUSCULAR E A SENSIBILIDADE À INSULINA
EM RATOS OBESOS**

**LOW INTENSITY AEROBIC TRAINING IMPROVES INFLAMMATION ON
MUSCLE AND INSULIN SENSITIVITY IN OBESE RATS**

Ana Carolina Panveloski-Costa (1), Bruna Brasil Brandão (1), Danilo Correa
Pinto Junior (1), Marcelo Papoti (2), Patricia Monteiro Seraphim (1)

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

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

RESUMO

Introdução: Durante a obesidade ocorre aumento de ácidos graxos livres na circulação e, conseqüentemente aumento do conteúdo de proteínas com efeitos negativos na sinalização da insulina. **Objetivo:** Avaliar o efeito do treinamento aeróbio na modulação de RNAm de GLUT4, TNF- α e SOCS3 em tecidos musculares esqueléticos e a sensibilidade à insulina periférica de ratos obesos por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos obesos por dieta hiperlipídica foram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio. A sensibilidade à insulina e o conteúdo de RNAm de TNF- α , SOCS3 e GLUT4 foram comparadas entre os grupos: obesos sedentários (OS) e exercitados (OE), controles sedentários (CS) e exercitados (CE). **Resultados:** Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram prejuízo da sensibilidade à insulina e aumento de RNAm de TNF- α e SOCS3. Mas o treinamento aeróbio reverteu todas essas alterações, principalmente em musculatura oxidativa. **Conclusões:** O treinamento aeróbio é eficiente para modular positivamente o conteúdo de RNAm de TNF- α e SOCS3 no músculo sóleo e melhorar a ação da insulina. No entanto, não surtiu efeitos na expressão de GLUT4.

Descritores: dieta hiperlipídica, treinamento aeróbio, GLUT4, SOCS3 e TNF- α

ABSTRACT

During obesity there is increase in free fatty acids circulation and consequently increase of the protein content with negative effects on insulin signaling. Objective: To evaluate the effect of aerobic training on modulation of GLUT4, TNF- α and SOCS3 mRNA in skeletal muscle tissue and peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by high fat diet. Methods: Obese rats were subjected to an aerobic training protocol. Insulin sensitivity and TNF- α , SOCS3 and GLUT4 mRNA content were compared among the groups: obese sedentary (OS) and exercised (OE), sedentary controls (CS) and exercised (CE). Results: Obese group presented impaired insulin sensitivity and increased mRNA of TNF- α and SOCS3, while the aerobic training reversed all of these changes, especially in oxidative muscle. Conclusions: Aerobic training is effective to modulate positively the mRNA of TNF- α and SOCS3 in the soleus muscle and improves insulin action, which did not change GLUT4 expression.

Key words: high fat diet, aerobic training, GLUT4, SOCS3 and TNF- α

1. INTRODUÇÃO

Durante a obesidade, ocorre desregulação da secreção de adipocinas no tecido adiposo que está associada ao aumento de ácidos graxos livres circulantes e, desenvolvimento de alterações em diversos órgãos (1). Dentre eles, destaca-se o tecido muscular esquelético, representando 40% da massa corpórea total, com acúmulo de triglicérides intramusculares (TGIM) e resistência à insulina (2).

Em humanos a concentração de diversas moléculas, tais como glicose, ácidos graxos, insulina e TNF- α , são aumentadas durante a obesidade, e estas moléculas têm mostrado papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina (3). Em nível celular, a redução generalizada da sinalização da insulina pode ser observada e, ocorrem defeitos através de diversos mecanismos. Primeiro, a atividade tirosina cinase do receptor de insulina é reduzida. Além do mais, o acoplamento dos substratos do receptor de insulina com o receptor de insulina é alterado. Como consequência, todos os eventos da via de sinalização da insulina estão defeituosos, e leva ao decréscimo da resposta celular. Diversas hipóteses, as quais não são mutuamente exclusivas, têm sido propostas para explicar estes defeitos (4).

Recentemente, uma nova classe de moléculas inibitórias, as chamadas proteínas Supressoras de Sinalização de Citocinas (SOCS), foi identificada (5). A proteína SOCS é induzida por diversas citocinas, em vários tecidos, de maneira tecido e citocina-específico(5). Uma vez induzida, ela é envolvida em retroalimentação negativa e leva à redução da sinalização de citocinas. Por sua capacidade de serem rapidamente induzidas e eficientes para inibir a via

Jak/Stat, as proteínas SOCS são potentes moduladoras fisiológicas de citocinas (6).

Embora a SOCS seja uma proteína originalmente pertencente à via de sinalização de citocinas, foi mostrado recentemente que ela também pertence ao circuito de sinalização da insulina (6). Quando expressa, a SOCS-3 localiza-se no citoplasma em condições basais. Após o tratamento com insulina, foi observado seu deslocamento para a membrana plasmática, onde pode interagir com o receptor da insulina (6).

Curiosamente, tem sido sugerida a participação do TNF- α na resistência à insulina na obesidade, com indução da expressão do SOCS-3 principalmente em tecido adiposo branco. Finalmente, em ratos obesos foi observada uma pronunciada redução na expressão da SOCS-3 no tecido adiposo branco transgênico desprovido da sinalização do TNF- α . Esse estudo mostra que o TNF- α , uma molécula conhecida por estar envolvida na resistência à insulina em ratos obesos, é responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão do SOCS-3 (7).

Alguns estudos têm mostrado que o exercício leva a uma redução ou a nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de citocinas (8). Todavia, a atividade física induz efeitos anti-inflamatórios locais no músculo esquelético que pode não ser refletido na circulação sistêmica, como evidenciado no estudo de Glielen et al. (9).

O treinamento físico resulta em alterações fenotípicas no músculo esquelético com alterações nas funções metabólicas e fisiológicas (10). O treinamento físico também melhora a sensibilidade à insulina no músculo esquelético (11). E numerosos estudos têm relatado atualmente que este pode

prevenir ou atenuar o início das condições crônicas tal como a obesidade ou a diabetes tipo 2 (12).

Petersen et al. (2005) demonstraram que o treinamento físico induz um aumento do conteúdo de citocinas com propriedades anti-inflamatórias. Dado que a massa muscular esquelética é a maior massa tecidual do corpo humano, a descoberta da contração muscular como produtor de citocinas abre um novo paradigma: o músculo esquelético é um órgão endócrino que por meio da contração muscular produz e libera citocinas, que pode influenciar o metabolismo e modificar a produção em tecidos e órgãos (13).

Segundo um estudo realizado por Lambert et al. (2008), no qual é comparado o efeito da perda de massa corporal e do treinamento físico sobre as alterações das citocinas inflamatórias em indivíduos obesos, o treinamento atua reduzindo a expressão dessas citocinas no músculo esquelético (14).

Nesse contexto, visto que a resistência à insulina, muitas vezes gerada pela obesidade, é fator preocupante mundial, e que a causa da resistência à insulina envolve deficiência entre sinalização do hormônio e transportador de glicose, este estudo pretende identificar os efeitos do treinamento aeróbio sobre a sensibilidade à insulina e quadro inflamatório através de análise de conteúdo de RNAm de GLUT4, e de TNF- α e SOCS-3, respectivamente, em tecidos musculares esqueléticos de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Quarenta ratos Wistar com dois meses de idade (180-200g) provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus Botucatu foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação na UNESP do Campus de Presidente Prudente sob condições padronizadas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias).

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 15/2009.

Desenho Experimental:

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: controle sedentário (CS); controle exercitado (CE); obeso sedentário (OS); obeso exercitado (OE).

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 OS e OE foram alimentados com uma dieta hiperlipídica adaptada de Lamas et al., 2004 composta por: bacon, mortadela, salsicha, bolacha e 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 (15). O peso corpóreo (PC) dos animais foi registrado semanalmente.

Após dois meses de dieta de hiperlipídica, com quatro meses de idade, os animais dos grupos exercitados (CE e OE) foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio. Os animais foram previamente selecionados para a realização do protocolo treinamento e os animais que resistiram, foram distribuídos nos grupos sedentários (CS e OS).

Os animais dos grupos exercitados (CE e OE) realizaram o protocolo de treinamento aeróbio em esteira rolante para animais de pequeno porte a uma velocidade constante de 9,75 metros por minuto. O treinamento foi realizado durante 45 minutos, uma vez por dia, cinco vezes por semana, durante seis semanas.

Lactacidemia:

Para caracterização do protocolo de treinamento, no 22º minuto e imediatamente após o término da última sessão de treinamento, foram coletados 25µ de sangue da veia caudal em capilares heparinizados e, transferidos para tubos eppendorfs contendo 50µ de NAF 1%. Posteriormente, o homogenato foi analisado em lactímetro eletroenzimático (Yellow Spring Instruments, YSI-1500 Co., EUA).

Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Para a avaliação da sensibilidade à insulina dos animais, foi realizado um teste de tolerância à insulina “in vivo”. Seis animais de cada grupo experimental foram mantidos no mesmo estado metabólico com jejum de 2 horas. As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal e os valores glicêmicos foram obtidos por meio de glicosímetro (Biocheck, Brasil) nos

tempos 0 (glicemia basal) e 4, 8, 12 e 16 minutos após a administração de insulina na dose 50 μ UI / 100 g peso corpóreo na veia peniana. Para este procedimento, os animais foram previamente anestesiados com xilasina e quetamina (0,3 mg / Kg de peso corpóreo).

Índice de Lee

O índice de Lee foi calculado para todos os animais pela divisão da raiz cúbica do peso corporal em gramas (g) pelo comprimento focinho-ânus em centímetros (cm) e multiplicando-se por 10 (16). Esse índice, proposto para animais experimentais, equivale ao índice de massa corporal (IMC) obtido para humanos(16).

Coleta do Material

Após 24 horas da última sessão de treinamento e sob a mesma condição fisiológica (2 horas de jejum), os animais foram sacrificados por meio de anestésico (mistura de xilasina e quetamina - 60 mg / kg do peso corporal de cada componente) por via intraperitoneal para a coleta de sangue da veia cava e posterior análise sérica de glicemia e triglicérides, para excisão do tecido adiposo branco da região periepididimal para pesagem em balança analítica e, dos tecidos musculares esqueléticos sóleo e EDL para quantificação de RNAm dos genes de GLUT4, SOCS3 e TNF- α .

Quantificação do RNAm

O RNA total das amostras dos músculos sóleo e EDL 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 através do cálculo da relação absorbância a 260 e 280 nm, bem como por coloração por brometo de etídio.

Para transcrição reversa, 5 µg 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 realizado a amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4 (sense 5' – CCCCTCCAGGGCAAAGGAT - 3', antisense: 5' - TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3'), TNF-α (Sense: 5' – AAGATGTCTCAGGCCTCC –3'; Antisense: 5' - AGACAGCTTCCCAACGAT -3') e da SOCS3 (Sense: 5' - CCTTTGAGGTTTCAGGAGCAG -3'; Antisense: 5' - GTAGCCACGTTGGAGGAGAG -3') através 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 software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para este fim. A expressão do RNAm para o gene Glut4 foi normalizada pela expressão da β-actina (sense 5' - ATGAAGATCCTGACG AGCGTG - 3' e antisense 5' – CTTGCTGATCCACA TCTGCTGG - 3'), calculada pela razão dos valores densitométricos de cada amostra para o gene Glut4 e o gene constitutivo.

Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do programa Instat. Os valores são expressos em média e erro padrão da média (EPM). O teste Kolmogorov–Smirnov revelou que os resultados dos experimentos apresentam distribuição normal. A comparação entre os grupos foi realizada usando o teste ANOVA one-way com Post-hoc de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor que 0,05.

3. RESULTADOS

Os valores lactacidêmicos obtidos na última sessão de treinamento confirmam que o treino foi realizado com predominância do metabolismo aeróbio (17). Além disso, a intensidade na qual o protocolo foi executado é de aproximadamente 50% da máxima fase estável de lactato (MFEL) (18).

Inserir figura 1.

Para induzir a obesidade nos animais foi ofertada uma dieta hiperlipídica composta por alimentos hipercalóricos a partir do segundo mês de idade. O peso corpóreo dos animais sedentários submetidos à dieta de hiperlipídica (OS) apresentou aumento de 22% em relação ao grupo CS e, 20% no grupo OE comprado ao grupo CE. (Tabela 1)

Inserir Tabela 1.

A eficácia da dieta hiperlipídica na indução da obesidade pôde ser evidenciada por meio dos valores de massa adiposa periepididimal aumentados nos grupos OE (41%) e OS (55%) quando comparados aos seus respectivos controles, CE e CS (Tabela 2). Consequentemente, o índice de Lee foi estatisticamente maior nos grupos obesos de ambos os gêneros em relação aos seus correspondentes controles (Tabela 1).

Embora, os animais alimentados com dieta hiperlipídica tenham apresentado aumento expressivo da massa adiposa periepididimal, os animais do grupo OE apresentaram redução significativa em resposta ao treinamento aeróbio. A massa muscular glicolítica (EDL) não apresentou alterações, no entanto, a massa muscular oxidativa (sóleo) apresentou aumento em decorrência do treinamento aeróbio, sendo observado incremento de 23% no grupo CE comparado ao grupo CS ($P<0,05$) e de 60% no grupo OE em relação do grupo OS ($P<0,001$) (Tabela 2).

Inserir Tabela 2.

Além dessas alterações morfométricas, a dieta hiperlipídica promoveu redução da sensibilidade à insulina como verificado por meio da constante de decaimento da curva obtida no teste de tolerância à insulina. A constante de decaimento da curva glicêmica apresentou-se reduzida nos animais do grupo OS ($3,6\pm0,62$) comparado ao grupo CS ($5,76\pm0,36$), $P<0,05$. No entanto os

animais submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio CE ($8,27 \pm 0,81$) e OE ($7,78 \pm 0,51$) apresentaram maior sensibilidade à insulina em relação ao grupo CS, $P < 0,05$ e OS e $P < 0,001$, respectivamente (Figura 2).

Inserir figura 2.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de glicemia e triglicérides obtidos após 2 horas de jejum. Os valores glicêmicos estavam elevados em todos os grupos, no entanto, a glicemia dos grupos obesos apresentou-se elevada em comparação ao grupo controle sedentário. Os valores de triglicérides apresentaram alteração apenas no grupo OE quando comparado ao grupo OS, com redução de 17% ($P < 0,05$).

Inserir Tabela 3.

A expressão de RNAm de GLUT4 não apresentou alterações no músculo sóleo, no entanto, no músculo EDL houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo CE e OE ($1,27 \pm 0,09$ vs $0,83 \pm 0,10$ UA).

Inserir Figura 3A e 3 B.

O conteúdo de RNAm de TNF- α e SOCS3 apresentaram aumentos expressivos nos animais sedentários alimentados com dieta hiperlipídica (OS) em relação aos animais sedentários alimentados com ração padrão (CS) no músculo oxidativo. No entanto, os animais obesos submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio (OE) apresentaram redução tanto da expressão de RNAm

de TNF- α ($P<0,05$) quanto de SOCS3 ($P<0,05$) em relação ao grupo OS. No entanto na musculatura glicolítica não foram observadas alterações na expressão de RNAm desses genes.

Inserir figura 4A e 4 B.

Inserir figura 5A e 5 B.

4. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que a ingestão de dieta hipercalórica está associada à resistência à insulina em humanos (19) e em animais (20). Tal alteração decorre do aumento expressivo da massa adiposa que leva a uma elevação da produção e liberação de proteínas que prejudicam a sinalização da insulina e que podem levar à redução do conteúdo de transportadores de glicose em tecidos insulino-sensíveis tais como o músculo esquelético e tecido adiposo (21).

No presente estudo, observou-se um aumento expressivo no peso corpóreo e na massa adiposa periepídimal dos animais submetidos à dieta de hiperlipídica em relação aos animais que receberam dieta padrão (Tabela 1). Esse dado evidencia que a dieta hiperlipídica utilizada nesse estudo foi eficiente para induzir a obesidade.

Como proposto por Mc Garry (2002) o acúmulo de depósitos de gordura no interior de órgãos sensíveis ao estímulo da insulina é um dos possíveis mecanismos de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (22).

No presente estudo observou-se redução significativa na percentagem de glicose captada durante o ITT nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica (OS) quando comparados com os animais que receberam dieta padrão (CS). Além disso, verificou-se maior concentração de glicemia nos animais alimentados com dieta de hiperlipídica, em comparação aos animais dos grupos controles. Portanto, tais resultados demonstram que a dieta hiperlipídica utilizada neste estudo também induz resistência à insulina.

Em contrapartida, os animais alimentados com dieta hiperlipídica submetidos ao treinamento aeróbico (OE) apresentaram melhora na sensibilidade à insulina quando comparados com os animais do grupo OS. Tais achados evidenciam o efeito benéfico do treinamento físico aeróbico sobre a melhora do quadro de resistência à insulina como demonstrado por Mota et al. (2008) e Botezelli et al. (2010) (23, 24). Adicionalmente, o grupo OE apresentou, simultaneamente, valores de triglicérides reduzidos e incremento da massa muscular oxidativa comparado ao grupo OS.

Goodpaster e Kelley (2002) verificaram aumento na sensibilidade à insulina em tecidos musculares em indivíduos treinados associado a níveis elevados de triglicérides (TAG), tal como encontrado na obesidade ou no Diabetes Mellitus (25). Da mesma forma, tanto o estoque de TAG quanto a sensibilidade à insulina é maior em músculos com fibras predominantemente do tipo I, do que os que possuem mais fibras tipo II (25). Dessa forma, a

capacidade oxidativa muscular mostra-se o melhor preditor da sensibilidade à insulina do que o conteúdo de TAG (26).

Inesperadamente, a redução da sensibilidade à insulina não foi acompanhada de alterações na expressão de GLUT4 na musculatura oxidativa. Da mesma forma Brandt et al. (2010) não verificaram alterações na expressão de GLUT4 ou na translocação para a membrana plasmática na fração oxidativa do músculo gastrocnêmio de ratos wistar submetidos à dieta de cafeteria e treinamento aeróbio realizado à 50% da MFEL (27). No entanto, na musculatura glicolítica analisada no presente estudo, os animais dos grupos obesos (OS e OE) apresentaram expressão de RNAm de GLUT4 reduzida em relação ao grupo CE, sugerindo que a expressão desse gene é mais sensível aos efeitos da dieta hiperlipídica em comparação aos do treinamento aeróbio em músculos com predominância de fibras tipo II.

Dessa forma, a melhora da sensibilidade à insulina observada no presente estudo pode ser atribuída à provável ativação da AMPK em decorrência do aumento da razão AMP/ATP promovida por meio das contrações musculares (28). Essa proteína é capaz de modular a oxidação de ácidos graxos de forma que, quando fosforilada, reduz a atividade da ACC (acetil CoA carboxilase) e portanto, aumenta a oxidação de ácidos graxos que, por sua vez, tem efeito sensibilizante à insulina (20, 29).

O acúmulo ectópico de lipídeos e a promoção de aumento de níveis de triglicérides intramusculares estão associados com aumento do conteúdo de diacilglicerol (DAG), ceramidas e acil coenzima A de cadeia longa (30,31). O DAG induz resistência à insulina por ativação da proteína cinase C (PKC θ) (32). A PKC θ , contribui ainda, com a ativação do fator nuclear Kappa B (NFkB)

por meio da fosforilação do inibidor do NFkB, o IkB. Uma vez fosforilado, o IkB libera NFkB que migra o citoplasma para o núcleo onde promove a transcrição de diversas proteínas pró-inflamatórias como o TNF- α (33).

Em consonância a estas observações, no presente estudo, os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram queda da sensibilidade à insulina e aumento de RNAm de citocinas pró-inflamatórias, na musculatura oxidativa. Em contrapartida o treinamento aeróbio promoveu redução de RNAm de TNF- α e SOCS3. Por outro lado, na musculatura glicolítica não se observou alterações na expressão destas citocinas, sugerindo que esta musculatura tem menor sensibilidade aos efeitos da obesidade e/ou do treinamento aeróbio.

Corroborando com os achados do presente estudo, Yaspelkis et al. (2009) observaram que os componentes da via pró-inflamatória são ativados em músculos esqueléticos de animais alimentados com dieta hipercalórica (34). Dentre os marcadores inflamatórios que se elevam durante a obesidade, o TNF- α induz a expressão de RNAm de SOCS-3. Os efeitos desta proteína na resistência à insulina decorrem da sua co-localização nas subunidades de IR- β e IRS-1 que resulta no impedimento da interação da IRS-1 com a subunidade da IR- β dessa forma, ocorre redução da atividade da PI3-kinase (35).

Os mecanismos moleculares que induzem a expressão da proteína SOCS-3 em resposta ao aumento da expressão de RNAm de TNF- α precisam ser melhor elucidados. Normalmente a transcrição de SOCS-3 estimulada por citocinas é induzida através da ativação dos fatores de transcrição da família STAT (36). Apesar de estudos mostrarem que o TNF- α ativa alguns membros da família STAT, é provável que o efeito da expressão de SOCS-3 pelo TNF- α seja indireto (7).

Uma das vias pela qual o TNF- α induz a resistência à insulina é o estímulo da lipólise no tecido adiposo, portanto o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres que eventualmente contribui para o desenvolvimento desse fenótipo resistente à insulina (37). E, de forma similar ao efeito da SOCS-3, o TNF- α também induz alterações na cascata de sinalização da insulina, devido a sua capacidade de inibir o estímulo pela insulina da atividade de tirosina quinase do receptor de insulina, o substrato do receptor de insulina (IRS-1) é fosforilado em serina e, portanto ocorre conversão do IRS-1 em um inibidor da tirosina quinase do receptor de insulina (38).

A literatura aponta efeito redutor da expressão de proteínas pró-inflamatórias no tecido muscular esquelético em resposta tanto aguda (39) quanto crônica ao treinamento físico aeróbio (35). De acordo com esses achados, no presente estudo, o treinamento aeróbio crônico propiciou melhora do quadro inflamatório induzido pela dieta hiperlipídica por meio da redução da expressão de marcadores inflamatórios, como TNF- α e SOCS-3.

A partir dos achados desse estudo pode-se concluir que a dieta hiperrlipídica promove aumento do peso corpóreo e da massa adiposa acompanhados de resistência à insulina periférica e aumento de marcadores pró-inflamatórios na musculatura oxidativa. No entanto, o treinamento físico aeróbio é eficiente para reverter tais promovidas pela dieta hiperlipídica.

5. REFERÊNCIAS

1. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 129–139.
2. Roden M. Muscle Triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for development of type 2 diabetes. *Int J Obes* 2005; 29:111-15.
3. Buettner R, Newgard, CB, Rhodes CJ, O'Doherty RM. Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(3): 563-69.
4. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 473-81.
5. Alexander WS, Hilton DJ. The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22(1):503-29.
6. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 15985-91.
7. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. *J Biol Chem* 2001; 276(51):47944-49.
8. Nicklas BJ, Ambrosius W, Messier SP, Miller GD, Penninx BW, Loeser RF, et al. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older,

- obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(4):544-51.
9. Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(5): 861-68.
 10. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 2003; 178(4): 413-24.
 11. Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 2005; 99(1): 338-43.
 12. Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE, Spangenburg EE. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol* 2002; 93(1): 3-30.
 13. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98(4): 1154-62.
 14. Lambert CP, Wright NR, Finck BN, Villareal DT. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. *J Appl Physiol* 2008; 105(2): 473-78.
 15. Lamas O, Martínez JA, Martí A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. *J Nutr Biochem* 2004; 15(7): 418-25.
 16. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968;40(4):527-8.

17. Beneke R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27(6):863-7.
18. Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Contarteze, R.V.L., Papoti, M., Mello, M.A.R. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev. Bras. Med. Esporte* 2006; 12: 259-62.
19. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes Review* 1997;46(1):3-10.
20. Pauli JR, Rpelle ER, Cintra DE, Souza CT. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK α em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. *Rev Bras Med Esporte* 2009; 15(2): 98-103.
21. Ribeiro-Filho FF, Mariosa SF, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 230-38.
22. McGarry JD. Banting Lecture 2001. *Diabetes* 2002; 51(1):7-18.
23. Mota CSA, Ribeiro C, Araújo GG, Araújo MB, Manchado-Gobatto FB, Voltarelli FA, Oliveira CAM, Luciano E, Mello MAR. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. *BioMed Central*. 2008; 8(11): 1-9.
24. Botezelli JD, Mora RF, Dalia RA, Moura LP, Cambri LT, Ghezzi AC, Voltarelli FA, Mello MAR. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *BioMed Central*. 2010; 9(116): 1-9.
25. Goodpaster BH, Kelley DE. Skeletal muscle trygliceride: marker or mediator of obesity-induced insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Curr Diab Rep*. 2002; 2:216-22.

26. Bruce CR, Anderson MJ, Carey AI, Newman DG, Bonen A, Kriketos AD. Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5444-51.
27. Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 August 1, 2010;299(2):E215-24.
28. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. *Biochem J* 2009; 418(2):261-75.
29. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest.* 2006; 116(3): 817-24.
30. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350:664–71.
31. van Loon LJ, Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 2006; 451:606–16.
32. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212:167–78.
33. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51:2005–11.

34. Yaspelkis BB, Kvasha IA, Figueroa TY. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /IKK β phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296(6): 1709-15.
35. Yaspelkis BB, Kvasha IA, Lessard SJ, Rivas DA, Hawley JA. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signalling in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110(4):779-88.
36. Krebs D, Hilton D. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 2000; 113(16): 2813-19.
37. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007; 48(4):751-62.
38. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11):4854-8.
39. Rosa Neto JC, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Batista Jr ML, Nascimento CMO, Seelaender M. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106:697–704.

TABELAS

Tabela 1. Peso Corpóreo (g), comprimento corporal (cm) e índice de Lee (raiz cúbica do peso corporal/ comprimento corporal x 10) (n=7 a 10 animais por grupo)

	CS	CE	OS	OE
Peso Corpóreo	415 ± 18,6	393 ± 14,2	538 ± 19,6 ^a	494,6 ± 14 ^{bc}
Comprimento	24,1 ± 0,38	24 ± 0,27	26,4 ± 0,3 ^{bc}	25,4 ± 0,3 ^d
Índice de Lee	3,01 ± 0,01	3,02±0,01	3,08 ± 0,01 ^{bc}	3,06±0,01 ^d

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS e CE ($P<0,001$)

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS ($P<0,01$)

^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao CE ($P<0,001$)

^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao CE e CS ($P<0,05$)

Tabela 2. Peso do Tecido adiposo periepídídimo (TA), Peso do Músculo EDL (M.EDL) e Peso do Músculo Sóleo (M.Sóleo) por grama de peso corpóreo (n=9 animais por grupo)

	CS	CE	OS	OE
TA (g)	10,78±1,44(10 ⁻³) ³⁾	6,96±0,46(10 ⁻³)	23,93±2,95(10 ⁻³) ³⁾ ^a	16,84±1,23(10 ⁻³) ³⁾ ^{bc}
M. EDL (g)	0,64±0,07(10 ⁻³)	0,64±0,05 (10 ⁻³)	0,70±0,04(10 ⁻³)	0,71±0,03(10 ⁻³)
M. Sóleo (g)	0,46±0,03(10 ⁻³)	0,60±0,03(10 ⁻³) ^d	0,48±0,03(10 ⁻³)	0,80±0,04(10 ⁻³) ^{ef}

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS e CE ($P<0,001$)

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS e OS ($P<0,05$)

^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao CE ($P<0,001$)

^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS ($P<0,05$)

^e Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS e OS ($P<0,001$)

^f Diferença estatisticamente significativa em relação ao CE ($P<0,01$)

Tabela 3. Glicemia (mg/dL) e triglicérides (mg/dL)

	CS	CE	OS	OE
Glicemia	203,4 ± 25,4	248 ± 9,6	270,7 ± 5,7 [#]	272,5 ± 11,1 [#]
TAG (mg/dL)	82,1 ± 21,7	68,8 ± 20,3	92,7 ± 3,7	76,8 ± 13 [*]

[#] Diferença estatisticamente significativa em relação ao CS ($P<0,05$)

^{*} Diferença estatisticamente significativa em relação ao OS ($P<0,05$)

FIGURAS

Figura 1.

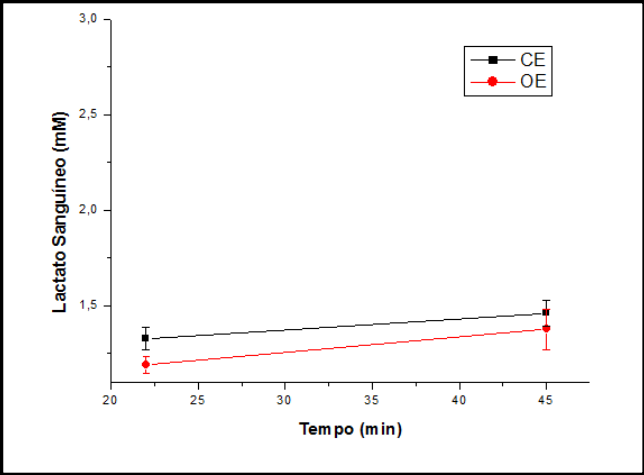


Figura 2.

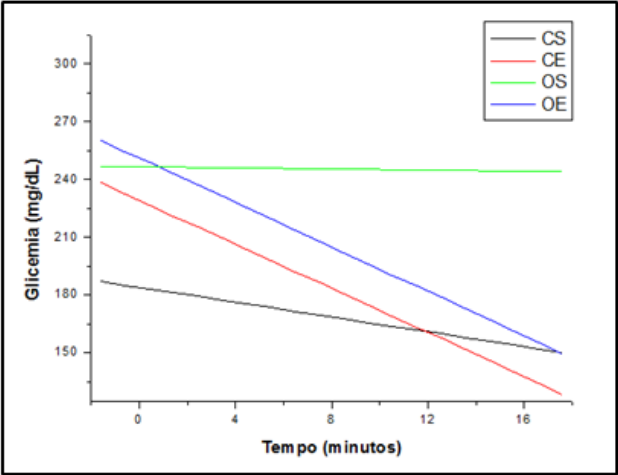


Figura 3A.

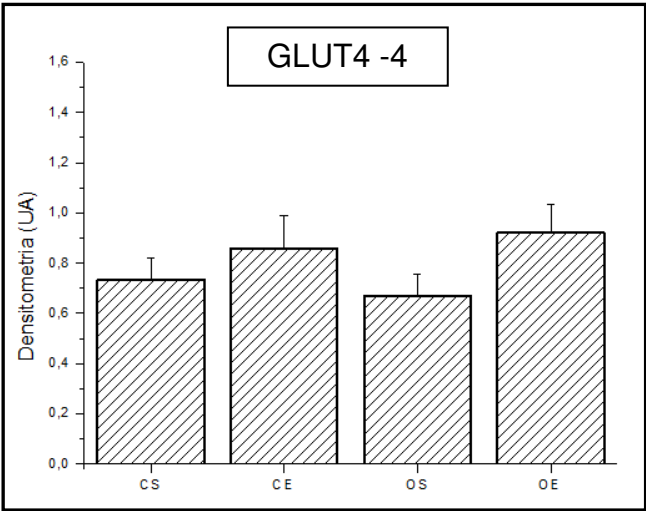


Figura 3B.

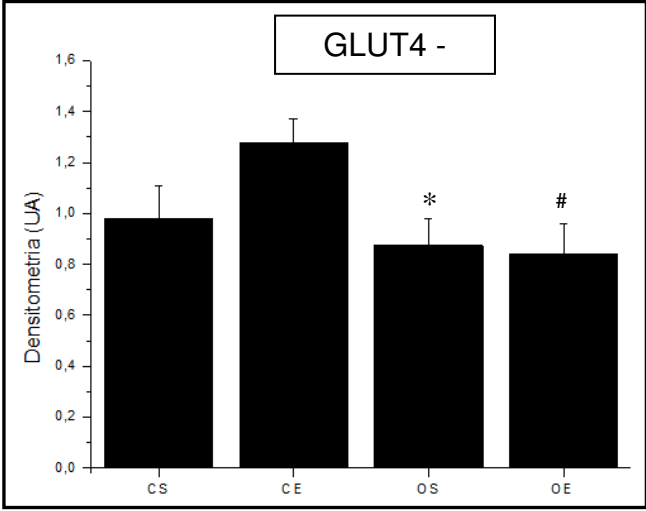


Figura 4A.

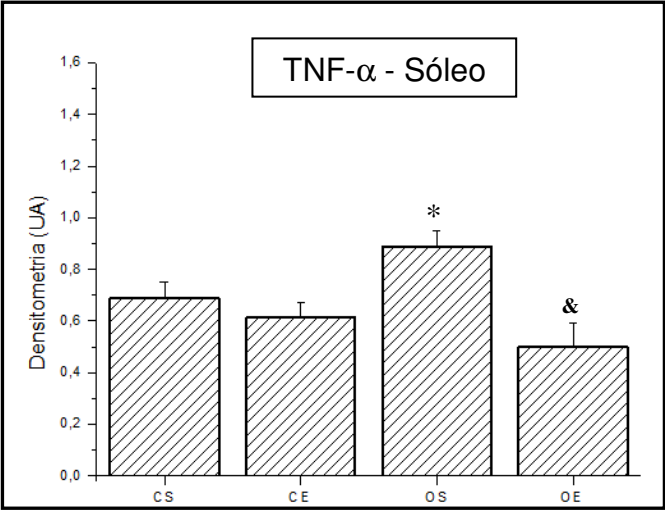


Figura 4B.

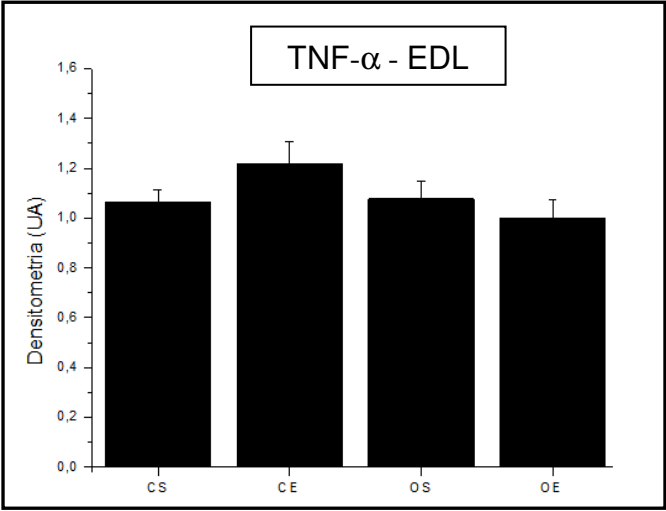


Figura 5A.

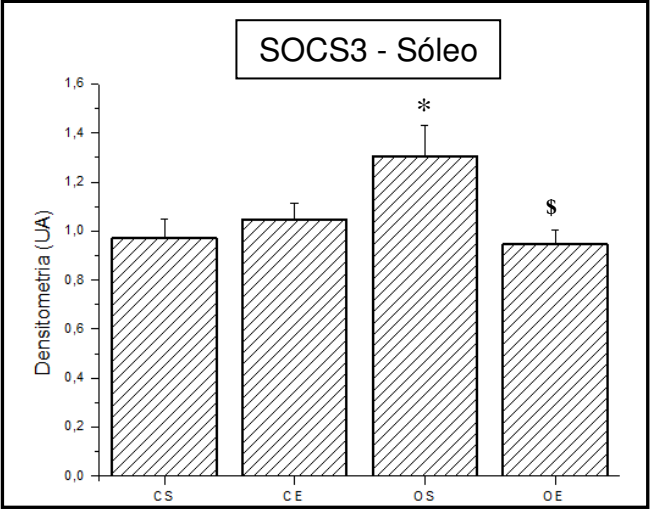
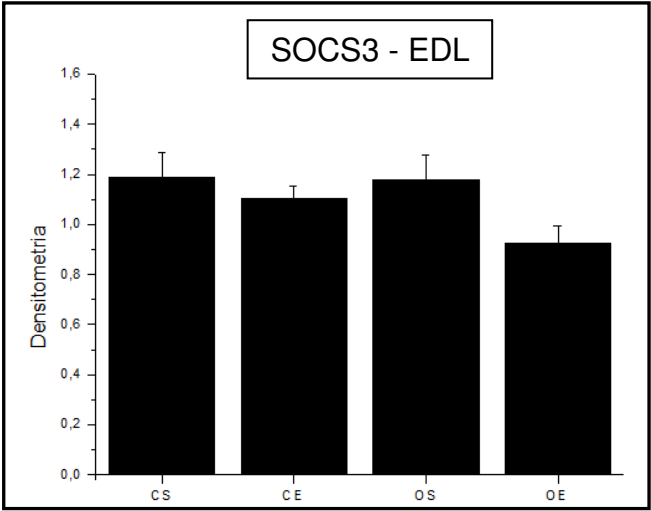


Figura 5B.



LEGENDAS

Figura 1. Gráfico representativo dos valores lactacidêmicos coletados nos 22^o minuto e logo após o término da última sessão de treinamento aeróbio. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em mmol/L, como média $\pm$ EPM (n= 5 animais por grupo).

Figura 2. Gráfico representativo da regressão linear obtida por meio dos valores da curva glicêmica obtida no teste de tolerância à insulina. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores glicêmicos e de tempo expressos em mg/dL e minutos respectivamente. (n=6 animais por grupo).

Figura 3A: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do GLUT4 corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular sóleo obtido em ensaios de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo).

Figura 3B: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do GLUT4 corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular EDL obtido em ensaios de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades

arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo). * $P<0,05$ vs CE, # $P<0,05$ vs CE.

Figura 4A: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do TNF- α corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular sóleo obtido em ensaios de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo). * $P<0,05$ vs CS, & $P<0,05$ vs OS.

Figura 4B: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do TNF- α corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular EDL obtido em ensaios de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo).

Figura 5A: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm de SOCS3 corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular sóleo obtido em ensaios de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo experimental). * $P<0,05$ vs CS, \$ $P<0,05$ vs OS.

Figura 5B: Gráfico representativo do conteúdo de RNAm de SOCS3 corrigido pelo conteúdo de RNAm de β -actina no tecido muscular EDL obtido em ensaios

de RT-PCR. Grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em UA (unidades arbitrárias), como média $\pm$ EPM (n=7 a 9 animais por grupo experimental).

**RESPOSTAS LACTACIDÊMICAS PROVENIENTES DE SESSÕES AGÚDAS
E CRÔNICAS DE TREINAMENTO INTERMITENTE DE ALTA INTENSIDADE
(JUMP SQUAT) EM RATOS WISTAR**

**BLOOD LACTATE RESPONSES FROM ACUTE AND CRHONIC
INTERMITTENT HIGH INTENSITY TRAINING (JUMP SQUAT) IN WISTAR
RATS**

Ana Carolina Panveloski-Costa (1), Marcelo Papoti (2), Rafael Junges Moreira (1), Patricia Monteiro Seraphim (1)

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

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

RESUMO

Durante contrações musculares de alta intensidade intervaladas por curtos períodos de tempo há importante participação do metabolismo glicolítico e, conseqüentemente aumento das concentrações de lactato sanguíneo. Objetivo: avaliar as respostas lactacidêmicas agudas e crônicas de treinamento intermitente de alta intensidade em ratos Wistar. Resultados: Foi observado aumento expressivo das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão aguda de exercício intermitente de alta intensidade (lactacidemia basal vs lactacidemia após último esforço, $P < 0,001$), em contrapartida, após 6 semanas de treinamento, ocorreu redução expressiva (49%) da resposta lactacidêmica ao exercício em relação à primeira sessão de treinamento, $P = 0,0002$. Conclusões: O exercício intermitente de alta intensidade realizado com intervalos de 60 segundos apresenta grande participação do sistema glicolítico, no entanto, o treinamento promove redução das respostas lactacidêmicas em resposta às contrações musculares intermitentes de alta intensidade, sugerindo, portanto melhora da capacidade de ressíntese de fosfatocreatina.

Palavras Chave: treinamento intermitente de alta intensidade, lactato sanguíneo

ABSTRACT

During muscle contractions in high intensity with short periods intervals there is important involvement of glycolytic metabolism and hence increased blood lactate concentrations. Objective: To evaluate the blood lactate responses to acute and chronic intermittent high intensity training in Wistar rats. Results: There was significant increase of blood lactate concentrations during the acute bout of high intensity intermittent exercise (basal blood lactate vs blood lactate after last effort, $P < 0.001$), however, after six weeks of training, there was significant reduction (49%) at blood lactate response to exercise in relation to the first training session, $P = 0.0002$. Conclusions: The high-intensity intermittent exercise performed at intervals of 60 seconds has a large participation of the glycolytic system, however, the training promotes reduction in blood lactate responses of twitches in response to intermittent high-intensity, suggesting better ability of phosphocreatine recovery.

Key Words: intermittent high intensity training, blood lactate

1. INTRODUÇÃO

A utilização das concentrações sanguíneas de lactato tem sido uma ferramenta constantemente utilizada como marcador de intensidade de exercício em humanos e em modelos animais (Gobatto et al. 2008). O uso desse metabólito possibilita a avaliação, prescrição e o monitoramento dos efeitos do treinamento aeróbio (Pyne et al. 2001). Dentre os protocolos de determinação da capacidade aeróbia constantemente utilizadas em humanos pode-se destacar a máxima fase estável de lactato (MFEL) (Beneke et al., 2003) que é atualmente considerado o padrão ouro na avaliação da capacidade aeróbia, esforços incrementais que utilizam aumento abrupto da lactacidemia (Stegmann e Kindermann, 1982), concentração fixa de lactato (Heck et al., 1985) e mais recentemente teste de lactato mínimo (Tegtbur et al. 1993).

A partir da determinação da MFEL (Goobatto et al. 2001) e de outros protocolos em modelo animal foi possível, assim como realizados em humanos a prescrição das intensidades de treinamento aeróbio com base na lactacidemia (Pilis et al., 1993 ; Gobatto et al. 2001; Voltarelli et al. 2002; Araújo et al., 2007 ; Manchado et al., 2006).

Além da avaliação aeróbia, as concentrações sanguíneas de lactato também tem sido utilizada na avaliação de parâmetros anaeróbios (Hill, 1999; Lacour et al., 1990; Korhonen et al., 2005). Além disso, esse metabólito recentemente tem sido utilizado para estimar indiretamente a contribuição do metabolismo anaeróbio láctico no fornecimento energético (di Prampero and Ferretti, 1999; Hunter et al., 2003; Mazzetti et al., 2007; Bertuzzi et al., 2010) e

na avaliação do metabolismo anaeróbio alático (Silva et al. , Santiago et al., 2010).

Dentre os modelos animais os ergômetros de treinamentos aeróbios tem sido frequentemente utilizados como esforços em esteira (Yaspelkis, 2009) e natação (Araújo et al., 2010). Para o treinamento anaeróbio diversos estudos tem utilizado treinamento com saltos realizados na água (Oliveira, 2002; Franco et al., 2007; Lima et al, 2008; Souza et al, 2008) e sobre plataforma por meio de estimulação elétrica (Tetsuro Tamaki et al., 1992; Baraúna, 2005) em diferentes condições nutricionais (Tonon et al. 2001) e patológicas (Lima, 2008).

Durante os protocolos com saltos são verificados e 3-4 séries compostas de 10-12 saltos separados por 60 – 90s de intervalo (Tonon, 2001; Baraúna et al. 2005). Além disso, o incremento da intensidade é realizado com a adição de peso referente à massa corporal (Souza, 2008) ou a uma repetição máxima (Faria, 2010).

Considerando que os estoques de fosfocreatina possibilitam a ressíntese de ATP em esforços com duração de até 10 segundos (Hultman, 1967) e apresentam tempo necessário de recuperação de 30 segundos a 5 minutos (Rockwell JA, 2001; Preen D, 2001), as séries iniciais desses modelos de treinamentos apresentam predominância anaeróbia alática. No entanto, devido o reduzido intervalo de repouso, nas séries subseqüentes será verificado significativo aumento da participação do sistema glicolítico, resultando, portanto em aumento das concentrações sanguíneas de lactato.

Recentemente foi demonstrado melhora na capacidade oxidativa após esforços intermitentes de baixo volume e alta intensidade (Burgomaster et al.

2008; Gibala & McGee, 2008; Gibala et al. 2009). A explicação para as respostas similares entre o treinamento tradicional aeróbio e o intermitente de alta intensidade, parece estar relacionada com aumento da biogênese mitocondrial pelo fato desse último, assim como as respostas classicamente observadas após estímulos aeróbios, também aumentarem a expressão gênica do PGC-1 α que parece ser o fator chave para a biogênese mitocondrial (Gibala et al. 2009; Little et al. 2010; Niklas et al. 2010).

Um dos mecanismos desencadeados pelo treinamento que culmina em aumento da expressão de PGC-1 α é a baixa disponibilidade de glicogênio muscular após o exercício associado ao estresse agudo da célula muscular, o qual, por sua vez, aumenta a ativação de algumas proteínas cinases envolvidas na biogênese mitocondrial tais como a Proteína Cinase ativada por AMP (AMPK) AMPK (Wojtaszewski *et al.* 2003; Steinberg *et al.* 2006) e proteína cinase ativada por mitógeno p-38 (MAPK p-38) (Chan *et al.* 2004).

A cascata AMPK é ativada por estresse celular que, por sua vez, reduz a relação ATP / ADP e eleva a quantidade de AMP como resultado da atividade de miocinases. Isso pode ocorrer tanto pela produção de ATP inibindo ou acelerando o consumo de ATP.

Nesse contexto, ao contrário dos modelos de treinamentos aeróbios, que são facilmente caracterizados por meio da resposta lactacidêmica e de testes de capacidade aeróbia, a disponibilidade estudos sobre a resposta lactacidêmica e, por consequência, a participação do sistema glicolítico e as consequentes adaptações à essa condição em exercícios que utilizam exercício intermitente de alta intensidade é limitada.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi investigar as respostas lactacidêmicas e da participação do sistema glicolítico durante treinamento agudo e crônico de ratos Wistars submetidos a um modelo de treinamento intermitente de alta intensidade tipo jump squat.

A hipótese da presente investigação é os modelos de treinamentos tipo jump squat separados por intervalo de aproximadamente um minuto apresenta significativa participação do sistema glicolítico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Dez ratos machos da linhagem Wistar adultos (120 dias) foram mantidos no biotério de experimentação na UNESP do Campus de Presidente Prudente, em gaiolas coletivas, não excedendo cinco ratos por gaiola, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram alimentados com ração padrão (Supra LAb – Alisul Ind. Alimentos LTDA., São Leopoldo, RS) e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 15/2009.

2.2. Programa de treinamento

O protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade foi realizado seguindo o modelo de força adaptado de Tetsuro Tamaki (1992). O aparelho foi projetado de maneira que o animal ficou imobilizado sobre uma plataforma metálica por meio um colete adaptado acoplado no tórax.

Para que o rato realizasse o salto (movimento de flexo-extensão completa de joelho e tornozelo), levantando uma carga que era posicionada na parte posterior do colete, foi aplicada uma estimulação elétrica utilizando clipe metálico que envolvia a extremidade da cauda do animal ligado a um eletroestimulador tipo Dualpex 961 da Quark, calibrado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Os parâmetros utilizados foram: frequência 1 Hz, duração de 0,3 s com intervalo de 2 s entre cada estimulação elétrica e, a intensidade foi ajustada de maneira que o animal executasse o movimento, variando de 3 a 6 mA miliampéres (mA). Esses parâmetros foram adotados por serem pulsos bidirecionais de média nula, não apresentando efeitos eletrolíticos, permitindo aplicações de longa duração sem risco de lesão dos tecidos.

Inserir Figura 1.

2.3. Desenho experimental

Os animais foram adaptados ao modelo de exercício uma semana antes do início do protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade. A

adaptação consistiu na realização de 3 sessões sem incremento de carga composta de 1, 2 e 3 séries de 12 repetições do primeiro ao terceiro dia respectivamente, com intervalo de 24 horas entre cada sessão.

Posteriormente foram submetidos a 6 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade. Nas 2 primeiras semanas o treino foi realizado sem incremento de carga e a partir da terceira semana foi incrementado uma carga equivalente a 50% do PC a qual foi monitorada semanalmente.

O protocolo de treinamento consistiu em 3 sessões por semana, intervaladas por 24 horas, sendo que cada sessão consistiu na realização de 3 séries de 12 repetições com intervalos de 1 minuto entre cada série.

2.4. Coleta e análise sanguínea

A cada 15 dias (6 sessões), as respostas lactacidêmicas foram monitoradas durante e ao final do treinamento. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente após a 1^o ($[La^-]_{1^a}$), 2^o ($[La^-]_{2^a}$) e 3^o ($[La^-]_{3^a}$) séries e nos 3^o (3^omin), 5^o (5^omin) e 7^o (7^omin) minutos após a última série de saltos, sendo que o maior valor lactacidêmico obtido ao final dos estímulos foi assumido como concentração pico de lactato ($[La^-]_{pico}$).

As amostras sanguíneas (25 μ L) foram coletadas por punção caudal em capilar heparinizado que foram imediatamente transferidas para tubos Eppendorff de 1,5 mL, contendo 50 μ L de solução de NaF a 1%. Posteriormente o homogenado foi congelado para posterior análise em lactímetro eletroenzimático Yellow Springs modelo 1500 Sport.

Inserir Figura 2.

2.5. Tratamento estatístico

A normalidade dos dados foi confirmada com o teste de Shapiro Wilk. Para comparação dos valores de peso corporal bem como as respostas lactacidêmicas durante a sessão aguda do treinamento e ao longo de seis semanas de treinamento intermitente de alta intensidade utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA – One Way) para medidas repetidas seguida, quando necessário com teste Post-hoc de Tukey. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Não foram observadas alterações significativas no PC dos animais ao longo do período de treinamento ($400,88 \pm 13,93g$).

Durante a sessão aguda, foram verificados aumentos significativos de 29%, 86% e 140% nas $[La^-]_{1^a}$, $[La^-]_{2^a}$ e $[La^-]_{3^a}$ respectivamente com relação ao repouso. Além disso, a $[La^-]_{pico}$ foi significativamente superior aos valores observados no repouso e $[La^-]_{1^a}$, $[La^-]_{2^a}$ e $[La^-]_{3^a}$ (Figura 3). No entanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os valores lactacidêmicos observados no 3º, 5º e 7º min.

Inserir Figura 3.

Foram verificadas significativas reduções em média de 32% na $[La^-]_{1^a}$, 46% na $[La^-]_{2^a}$ e 48% $[La^-]_{3^a}$ em T2, T3 e T4 quando comparado a T1. A $[La^-]_{1^a}$ em T3 e T4 apresentou-se 24% e 25%, respectivamente, menor em relação a $[La^-]_{1^a}$ em T2 ($P<0,05$). Além disso, a $[La^-]_{2^a}$ em T4 foi significativamente menor (25%) em comparação a T3 ($P<0,05$). No entanto a $[La^-]_{3^a}$ apresentou diferença significativa em T2, T3 e T4 somente quando comparadas a T1 (Figura 4).

Inserir Figura 4.

As $[La^-]_{pico}$ obtidas em T2, T3 e T4 apresentaram redução de aproximadamente 35% , 39% e 49%, respectivamente, em relação a obtida em T1 ($P=0,0002$). Além disso, a $[La^-]_{pico}$ em T4 apresentou 22% de redução em comparação a T2 ($P=0,004$) (Figura 5).

Inserir Figura 5.

4. DISCUSSÃO

A prática de atividade física representa uma ferramenta importante para a reversão das alterações metabólicas de diversas patologias como a obesidade, diabetes melitus tipo 2 e doenças cardiorespiratórias (Knowler et al., 2002; Handschin e Spiegelman, 2008). Atualmente, as respostas metabólicas em decorrência do treinamento aeróbio já estão bem

estabelecidas, no entanto, em relação ao treinamento anaeróbio ainda carecem de estudos.

As concentrações de lactato sanguíneo permitem avaliar a predominância da participação do sistema aeróbio ou anaeróbio em resposta a um exercício físico agudo ou crônico. Portanto, têm sido utilizadas para predição da intensidade do exercício físico, visando a otimização do desempenho e/ou minimização das alterações metabólicas patológicas e, para a avaliação das respostas metabólicas ao treinamento (Wells et al., 2009).

Os principais achados do presente estudo foram a significativa participação do sistema glicolítico após exercício intermitente de alta intensidade e a redução das concentrações pico de lactato após seis semanas de treinamento.

Durante as fases iniciais de exercício de alta intensidade, o ATP é quebrado através da enzima ATPase, e a fosfatocreatina é quebrada pela enzima creatina cinase para a ressíntese de ATP. Para a realização de exercício intenso de mais de 12 -15 segundos e menos de 3 minutos de duração, o organismo depende principalmente do metabolismo anaeróbico para produção de energia (Wells et al., 2009).

O treinamento físico de alta intensidade realizados por curtos períodos de tempo tem efeitos significativos sobre o sistema glicolítico anaeróbio, de forma que o aumento da produção de ATP é acompanhado por aumento da produção de lactato muscular (Laursen, 2002).

No presente estudo, durante a sessão de treinamento, pode-se observar que a resposta lactacidêmica apresenta aumento progressivo ao longo do tempo, com concentrações de lactato pico no 7^o minuto de recuperação. Esta

resposta, após cada série da sessão de treinamento, ocorre em consequência do intervalo entre cada série (60 segundos), de forma que não há tempo suficiente para que haja reposição dos estoques de fosfatocreatina (PCr) e, portanto, o sistema glicolítico contribui para gerar ATP e, consequentemente, ocorre “sobreposição” dos valores de lactato entre as séries.

Aumentos na concentração de lactato sanguíneo também foram observadas por Gorostiaga et al. (2010) associado à menor contribuição da PCr após 10 repetições máximas (RM) de extensão de joelho (leg press) quando comparada à uma série de 5 RM.

Ainda nesse estudo Gorostiaga et al. (2010), o protocolo de exercício produziu fadiga e mudanças no conteúdo de PCr muscular, lactato e intermediários glicolíticos em maiores níveis, como reportado após 30 segundos de *sprints* no ciclismo (Boobis et al., 1987; Medbo e Tabata, 1993; Jones et al., 1985; Parolin et al., 1999), *sprints* máximos de corredores (Boobis et al., 1987; Spriet et al., 1987) ou durante contrações isométricas, isocinéticas (Jones et al., 1985) ou eletricamente estimuladas (Bergstrom e Hultman, 1988; Hultman e Sjöholm, 1983). A participação da via glicolítica e da via fosfogênio para a produção de ATP nesses modelos de exercício variou em torno de 60-70% e 30-40%, respectivamente, o que explica a maior produção de ATP, em concordância com os resultados do presente estudo.

Os maiores valores $[La^-]_{1^a}$, $2^0 [La^-]_{2^a}$ e $3^0 [La^-]_{3^a}$ e $[La^-]_{pico}$ foram observados no primeiro dia de coleta, ou seja, na primeira sessão de treinamento. Sabe-se que as concentrações plasmáticas de epinefrina e norepinefrina aumentam durante o exercício físico e (Schneider, 2000; Fattor,

2005)., tem sido relatado forte correlação entre concentrações plasmáticas de catecolaminas e lactato (Krzeminski, 2000).

O sistema B-adrenérgico, a epinefrina, em particular, é um forte estimulador da glicogenólise muscular (Prats et al., 2009). Infusão de epinefrina em humanos, aumenta o lactato sanguíneo em repouso (Staten et al., 1987), durante o exercício (Gaesser et al., 1982) e, durante estimulação elétrica (Spriet et al., 1988). Por outro lado, o bloqueio de receptores B-adrenérgicos resulta em redução do lactato muscular e sanguíneo (Hamann, 2001).

Possivelmente, na primeira sessão de treinamento houve maior ativação do sistema simpático, em resposta ao estresse pelo qual os animais foram submetidos, apesar de serem previamente adaptados ao modelo experimental. Isso refletiu em maior resposta lactacidêmica na primeira sessão de treinamento quando comparada às sessões subseqüentes.

No entanto, ao longo do protocolo de treinamento, os valores de lactato sanguíneo apresentaram redução significativa em relação ao primeiro dia de treino, além disso, houve diferença expressiva do segundo para o último dia de coleta.

O treinamento pode promover alterações nos níveis de ATP e PCr armazenados no músculo. O treino de força pode resultar em um aumento de aproximadamente 20% de ATP e PCr (MacDougall et al., 1977), enquanto que o treinamento sprint parece não alterar os estoques de ATP ou PCr (Dawson et al., 1998). Há indícios de que essas modalidades de treinamento modulem enzimas associadas ao sistema fosfato de alta energia, mais especificamente a ATPase e a creatina cinase (Costill et al., 1979; Vikne et al., 2006).

Larsen et al. (2009) verificou que a constante de recuperação de PCr após a realização de máxima contração voluntária isométrica dos músculos tibial anterior e vasto lateral com redução de 50% dos valores de PCr basais, em indivíduos ativos é maior que em indivíduos sedentários.

Da mesma forma, Yoshida (2002), observou maior velocidade de recuperação de PCr (63%) no músculo bíceps femoral de jovens corredores quando comparado ao de jovens sedentários. Essa magnitude de diferença na constante de recuperação da PCr foi similar ao encontrado por Larsen et al. (2009).

Essas inferências, portanto sugerem que houve melhora do sistema de ressíntese de PCr, ou seja, aumento dos estoques de PCr muscular em resposta ao treinamento no presente estudo.

A taxa de ressíntese de PCr é diretamente proporcional à taxa de fosforilação oxidativa (McCully et al., 1993; Paganini et al., 1997) e tem sido usada como uma medida não-invasiva da função mitocondrial *in vivo* em larga escala na população, incluindo indivíduos treinados e não treinados (Haseler et al., 1999; Haseler et al., 2004; Johansen e Quistorff, 2003, Yoshida, 2002).

Em concordância com o estudo realizado por Yoshida et al. (2002), Mogensen et al. (2006) reportaram taxas de respiração mitocondrial e atividade da citrato sintase 41% mais altas no músculo vasto lateral de indivíduos treinados quando comparados à não treinados.

Embora, a melhora da capacidade oxidativa como resultado de treinamento aeróbio seja um consenso na área da fisiologia, recentes estudos têm sugerido que exercícios realizados em intensidades críticas induzem alterações na capacidade oxidativa (Gibala, 2009). Em um estudo

(Burgomaster et al., 2008) conduzido em indivíduos jovens, 6 semanas de esforços máximos intervalados, induziram melhora em marcadores de capacidade oxidativa no músculo vasto lateral, semelhante a de um treinamento aeróbio, apesar do volume de treino ter sido significativamente menor (225 vs. 2,250 kJ/semana).

Forbes et al. (2008) também utilizaram o protocolo de esforços máximos intervalados e demonstraram melhora na taxa de ressíntese de PCr no quadríceps de adultos após 2 semanas de treinamento. Como já citado, a taxa de ressíntese de PCr é diretamente proporcional à taxa de fosforilação oxidativa, dessa forma, reflete contribuições tanto do metabolismo glicolítico quanto do oxidativo (McCully et al., 1993; Paganini et al., 1997; Forbes et al., 2009)

Estudos em animais (Atherton et al., 2005) têm mostrado que estimulação elétrica em músculos isolados com pulsos de baixa frequência por períodos prolongados (mimetizando treinamento aeróbio) ou de alta frequência por curtos períodos (mimetizando treinamento anaeróbio) ativa seletivamente cascatas de sinalização associadas à biogênese mitocondrial (AMPK) (Gibala, 2009).

De acordo com nossos resultados, pode-se inferir que a redução dos valores lactacidêmicos em resposta a esse modelo de treinamento foi promovida por aumento, principalmente, dos estoques de PCr. No entanto, considerando-se que esforços de alta intensidade realizados em um curto período de tempo estimulam a biogênese mitocondrial por aumentos na expressão de PGC1- α . Como proposto por Gibala (2009), a menor resposta

lactacidêmica nesse modelo pode também ser resultante da melhora da capacidade oxidativa.

Dessa forma, esse modelo experimental nos permite propor que esforços físicos de alta intensidade e baixo volume sejam utilizados para promover adaptações no metabolismo com simultânea melhora da utilização dos substratos energéticos em decorrência da melhora da biogênese mitocondrial.

Esse dado é de extrema importância considerando que em condições patológicas, como na obesidade e diabetes Melitus tipo 2, os indivíduos apresentam baixa tolerância ao exercício e, portanto, esforços de alta intensidade realizados em baixo volume poderiam ser utilizados para estimular a melhora da capacidade oxidativa, o que aumentaria então a tolerância a exercícios de longa duração, normalmente utilizados nessas condições para otimizar a utilização da glicose (Yaspelkis, et al., 2002) e dos ácidos graxos (Pilegaard et al., 2000) como substrato energético. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para evidenciar os efeitos desse modelo de treinamento nessas condições patológicas.

A partir desse modelo experimental de exercício intermitente de alta intensidade, podemos concluir que contrações musculares de alta intensidade intervaladas por 60 segundos apresentam significativa participação do sistema glicolítico e melhora a ressíntese de PCr.

5. REFERÊNCIAS

- Araujo, G.G., Papoti, M., Manchado, F.B., Mello, M.A.R., Gobatto, C.A., 2007. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 148, R888–892.
- Antonutto, G., di Prampero, P.E., 1995. The concept of lactate threshold. A short review. *J. Sports. Med. Phys. Fitness.* 35, R6-12.
- Araujo, G.G., Araújo, M.B., Dangelo, R.A., Manchado, F.B., Mota, C.S.A., Ribeiro, C., Mello, M.A.R., 2009. Maximal lactate steady state in obese rats of both genders. 15, R46-49.
- Baraúna, V.G., Junior, M.L.B., Costa Rosa, L.F.B.P., Casarini, D.E., Krieger, J.E., Oliveira, E.M., 2005. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32, R249–254.
- Beneke, R., 2003. Maximal lactate steady state concentrations (MLSS): experimental and modelling approaches. *Eur. J. Appl. Physiol.* 88, R361–369.
- Bergstrom, M., Hultman, E., 1988. Energy cost and fatigue during intermittent electrical stimulation of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 65, R1500–1505.
- Bertuzzi, R.C.M., Silva, A.E.L., Pires, F.O., Kiss, M.A.P.D., 2010. Visual determination of the fast component of excessive oxygen uptake after exercise. *Rev Bras Med.* 16, R139-143.

Boobis, L.H., 1987. Metabolic aspects of fatigue during sprinting. In: Mcloed D, Maughan R, Nimmo M, Reilly, Williams C, (Eds), Exercise: benefits, limits and adaptations. London, pp 116–143.

Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Phillips, S.M., Rakobowchuk, M., Macdonald, M.J., McGee, S.L., Gibala, M.J., 2008. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol.* 586, R151–160.

Costill, D.L., Coyle, E.F., Fink, W.F., Lesmes, G.R., Witzmann, F.A., 1979. Adaptations in skeletal muscle following strength training. *J. Appl. Physiol.* 46, R96–99.

Dawson, B., Fitzsimons, M., Green, S., Goodman, C., Carey, M., Cole, K., 1998. Changes in performance, muscle metabolites, enzymes and fibre types after short sprint training. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 78, R163–169.

di Prampero, P.E., Ferretti, G., 1999. The energetics of anaerobic muscle metabolism: a reappraisal of older and recent concepts. *Respir. Physiol.* 118, R103-115.

Faria, T.O., Targueta, G.P., Angeli, J.K., Almeida, E.A.S., Stefanon, I., Vassallo, D.V., Lizardo, J.H.F., 2010. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent

relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 110, R359–366.

Fattor, J.A., Miller, B.F., Jacobs, K.A., Brooks, G.A., 2005. Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the "lactate clamp". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, R143-7.

Franco, F.S.C., Natali, A.J., Costa, N.M.B., Lunz, W., Gomes, G.J., Junior, M.A.C., Oliveira, T.T., 2007. Effects of creatine supplementation and power training on performance and lean body mass of rats. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 13, R297-302.

Forbes, S.C., Paganini, A.T., Slade, J.M., Towse, T.F., Meyer, R.A., 2009. Phosphocreatine recovery kinetics following low- and high-intensity exercise in human triceps surae and rat posterior hindlimb muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R161–170.

Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M. F., Smith, J. T., Habinowski, S. A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M. J., Witters, L. A., 2000. Exercise induces isoform-specific increase in 5AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, R1150-1155.

Gaesser, G.A., Ward, S.A., Baum, V.C., Whipp, B.J. The effects of infused epinephrine on the "excess" O₂ uptake of heavy exercise in humans (Abstract). *FASEB J.* 6, R1236.

Gibala, M.J., McGee, S.L., 2008. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: A little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev.* 36, R58-63.

Gibala, M., 2009. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, R428–432.

Gobatto, C.A., Mello, M.A.R., Manchado-Gobatto, F.B., Papoti, M., Voltarelli, F.A., Contarteze, R.V.L., Araujo, G.G., 2008. Adapted physiological evaluations to rodents: applications to the training in different experimental models. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte.* 7, R137-147.

Gorostiaga, E.M., Navarro-Amézqueta, I., Cusso, R., Hellsten, Y., Calbet, J.A.L., Guerrero, M., Granados, C., González-Izal, M., Ibáñez, J., Izquierdo, M., 2010. Anaerobic Energy Expenditure and Mechanical Efficiency during Exhaustive Leg Press Exercise. *PLoS One.* 5, E13486, R1-11.

Johansen, L., Quistorff, B., 2003. ³¹P-MRS characterization of sprint and endurance trained athletes. *Int. J. Sports Med.* 24, R183–189.

Jones, N.L., McCartney, N., Graham, T., Spriet, L.L., Kowalchuk, J.M., 1985. Muscle performance and metabolism in maximal isokinetic cycling at slow and fast speeds. *J. Appl. Physiol.* 59, R132–136.

Hamann, J.J., Kelley, K.M., Gladden, L.B., 2001. Effect of epinephrine on net lactate uptake by contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, R2635-41.

Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2008. The role of exercise and PGC-1 in inflammation and chronic disease. *Nature*. 454, R463-9.

Haseler, L.J., Hogan, M.C., Richardson, R.S., 1999. Skeletal muscle phosphocreatine recovery in exercise-trained humans is dependent on O₂ availability. *J. Appl. Physiol.* 86, R2013–2018.

Haseler, L.J., Lin, A.P., Richardson, R.S., 2004. Skeletal muscle oxidative metabolism in sedentary humans: ³¹P-MRS assessment of O₂ supply and demand limitations. *J. Appl. Physiol.* 97, R1077–1081.

Hultman, E., Sjöholm, H., 1983. Energy metabolism and contraction force of human skeletal muscle in situ during electrical stimulation. *J. Physiol.* 345, R525–532.

Hunter, G.R., Seelhorst, D., Snyder, S., 2003. Comparison of metabolic and heart rate responses to super slow vs. traditional resistance training. *J. Strength. Cond. Res.* 17, R76-81.

Korhonen, M.T., Suominen, H., Mero, A., 2005. Age and sex differences in blood lactate response to sprint running in elite master athletes. *Can. J. Appl. Physiol.* 30, R647-665.

Knowler, W.C., Barret-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, R393-403.

Krzemiński, K., Kruk, B., Nazar, K., Ziemba, A.W., Cybulski, G., Niewiadomski, W., 2000. Cardiovascular, metabolic and plasma catecholamine responses to passive and active exercises. *J. Physiol. Pharmacol.* 51, R267-78.

Lacour, J.R., Bouvat, E., Barthelemy, J.C., 1990. Post-competition blood lactate concentrations as indicators of anaerobic energy expenditure during 400-m and 800-m races. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 61, R172-176.

Larsen, R.G., Callahan, D.M., Foulis, S.A., Kent-Braun, J.A., 2009. In vivo oxidative capacity varies with muscle and training status in young adults. *J. Appl. Physiol.* 107, R873–879.

Laursen, .PB., Rhodes, E.C., Langill, R.H., McKenzie, D.C., Taunton, J.E., 2002. Relationship of exercise test variables to cycling performance in an Ironman triathlon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 87, R433-40.

Lima, C., Alves, L.E., Iagher, F., Machado, A.F., Bonatto, S.J., Kuczera, D., Souza, C.F., Pequito, D.C., Muritiba, A.L., Nunes, E.A., Fernandes, L.C., 2008. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104, R957–964.

Little, J.P., Safdar, A., Wilkin, G.P., Tarnopolsky, M.A, Gibala, M.J., 2010. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J. Physiol.* 588.6, R1011–1022.

MacDougall, J.D., Ward, G.R., Sale, D.G., Sutton, J.R., 1977. Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 43, R700–703.

Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Contarteze, R.V.L., Papoti, M., Mello, M.A.R., 2006. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 12, R259-262.

Mazzetti, S., Douglass, M., Yocum, A., Harber, M., 2007. Effect of explosive versus slow contractions and exercise intensity on energy expenditure. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39,R1291-1301.

McCully, K.K., Fielding, R.A., Evans, W.J., Leigh, J.S., Posner, J.D., 1993. Relationships between in-vivo and in-vitro measurements of metabolism in young and old human calf muscles. *J. Appl. Physiol.* 75, R813–819.

Medbo, J.I., Tabata, I., 1993. Anaerobic energy release in working muscle during 30s to 3 min of exhausting bicycling. *J. Appl. Physiol.* 75, R1654–1660.

Mogensen, M., Bagger, M., Pedersen, P.K., Fernstrom, M., Sahlin, K., 2006.

Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *J. Physiol.* 571, R669–681.

Niklas, P., Li, W., Jens, W., Michail, T., Kent, S., 2010. Mitochondrial gene expression in elite cyclists: effects of high-intensity interval exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*

Oliveira, C.A.M., Rogatto, G.P., Luciano, E., 2002. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 8, R219-224.

Paganini, A.T., Foley, J.M., Meyer, R.A., 1997. Linear dependence of muscle phosphocreatine kinetics on oxidative capacity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 272, R501–510.

Parolin, M.L., Chesley, A., Matsos, M.P., Spriet, L.L., Jones, N.L., 1999. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH during maximal intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 277, R890–900.

Pilegaard, H., Ordway, G.A., Saltin, B., Neufer, P.D., 2000. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, R806–814.

Prats, C., Helge, J.W., Nordby, P., Qvortrup, K., Ploug, T., Dela, F., Wojtaszewski, J.F., 2009. Dual regulation of muscle glycogen synthase during

exercise by activation and compartmentalization. *J. Biol. Chem.* 284, R15692-700.

Preen, D., Dawson, B., Goodman, C., Lawrence, S., Beilby, J., Ching, S., 2001. Effect of creatine loading on long-term sprint exercise performance and metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 33, R814-821.

Pyne, D.B., 2001. Validation of the Yis Method for Determining the Lactate Threshold in Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, R-301.

Rockwell, J.A., Rankin, J.W., Toderico, B., 2001. Creatine supplementation affects muscle creatine during energy restriction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, R61-68.

Spriet, L.L., Ren, J.M., Hultman, E., 1988. Epinephrine infusion enhances muscle glycogenolysis during prolonged electrical stimulation. *J. Appl. Physiol.* 64, R1439-1444.

Souza, C.F., Machado, A.F., Bonatto, S.J.R., Grando, F.C.C., Pessini, C., Alves, L.E., Lima, C., Brito, G.A.P., Nunes, E.A., Fernandes, L.C., 2008. Neutrophil response of anaerobic jump trained diabetic rats. *Eur J Appl Physiol.* 104, R1079–1086.

Staten, M.A., Matthews, D.E., Cryer, P.E., Bier, D.M., 1987. Physiological increments in epinephrine stimulate metabolic rate in humans. *Am. J. Physiol.*

253, R322- R330.

Schneider, D.A., McLellan, T.M., Gass, G.C., 2000. Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 32, R608-13.

Stegmann, H., Kindermann, W., 1982. Comparison of prolonged exercise tests at the individual anaerobic threshold and the fixed anaerobic threshold of 4 mmol.l⁻¹ lactate. *Int. J. Sports Med.* 3, R105-110 .

Tegtbur, U., Busse, M.W., Braumann, K.M., 1993. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25, R620-627.

Tonon, C.R., Mello, M.A.R., Dias, T.F., Anaruma, C.A., 2001. Teor Protéico da Dieta e Crescimento Muscular em Ratos Submetidos ao Treinamento Anaeróbio. *Motriz.* 7, R69-74.

Vikne, H., Refsnes, P.E., Ekmark, M., Medbo, J.I., Gundersen, V., Gundersen, K., 2006. Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, R1770–1781.

Wells, G.D., Selvadurai, H., Tein, I., 2009. Bioenergetic provision of energy for muscular activity Mini-symposium: The Clinical Applications of Exercise Testing in Children. *Paediatr. Respir. Rev.* 10, R83–90.

Yaspelkis, B.B., Kvasha, I.A., Figueroa, T.Y., 2009. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS3, IKK α / β phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1709-15.

Yaspelkis, B.B., Singh, M.K., Trevino, B., Krisan, A.D., Collins, D.E., 2002. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 175, R315–323.

Yoshida T., 2002. The rate of phosphocreatine hydrolysis and resynthesis in exercising muscle in humans using ^{31}P -MRS. *J. Physiol. Anthropol. Appl. Human. Sci.* 21, R247–255.

FIGURAS

Figura 1.

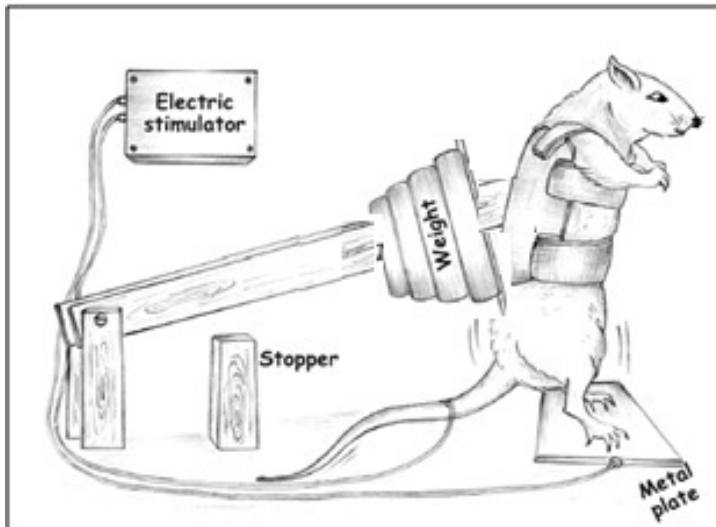


Figura 2.

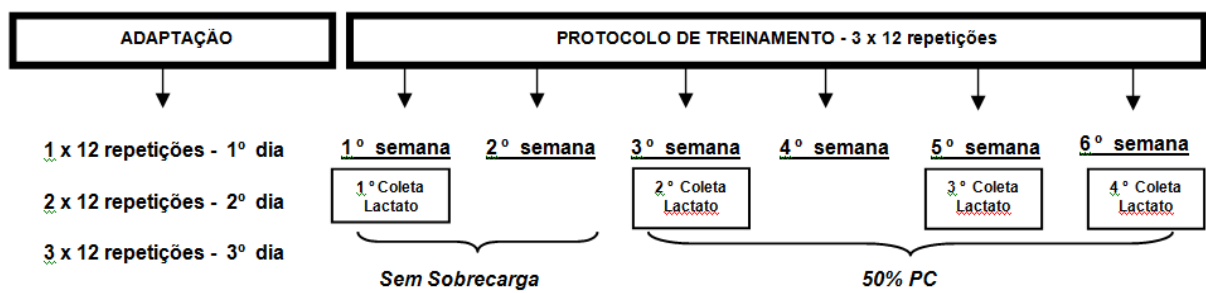


Figura 3.

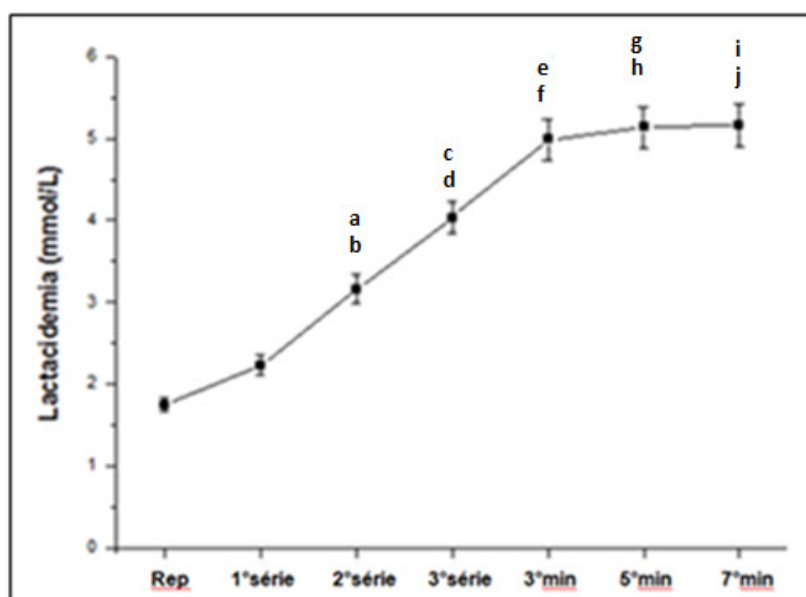


Figura 4.

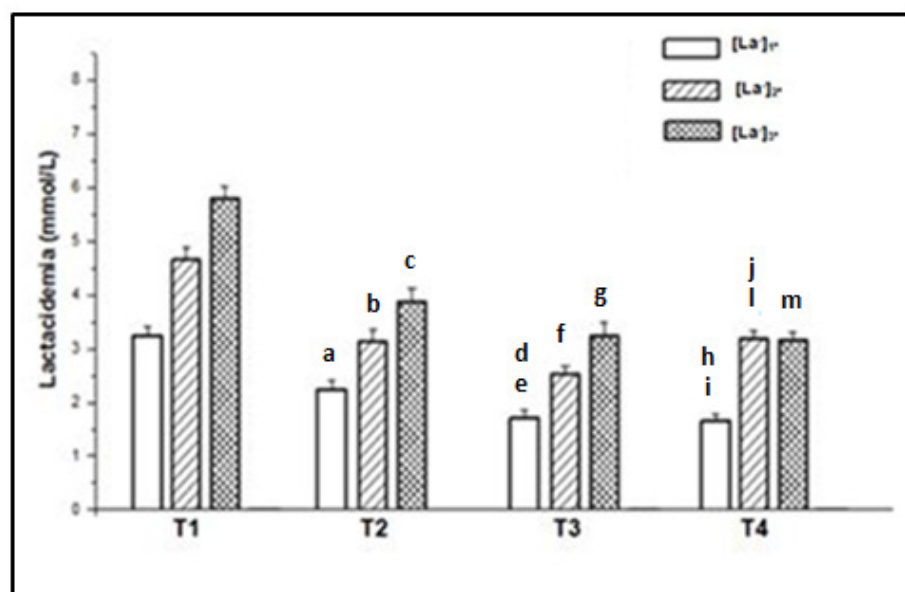
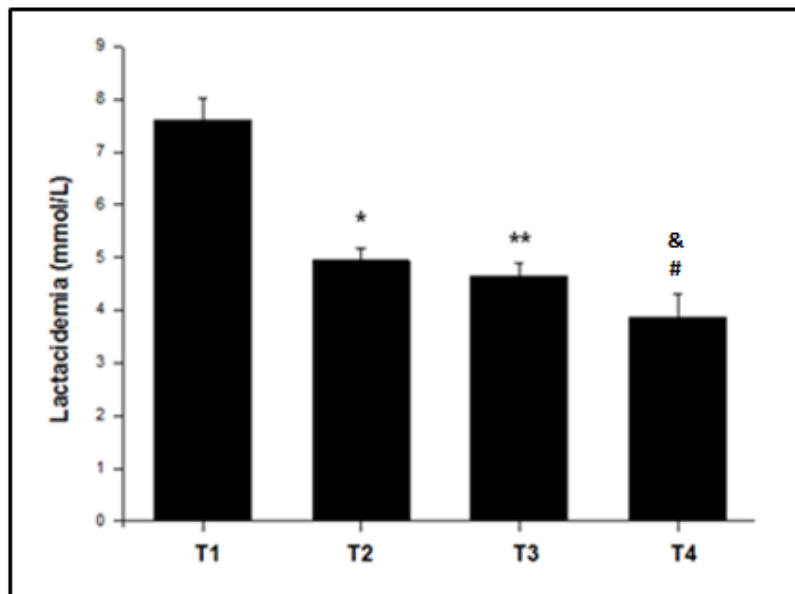


Figura 5.



LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 2. Plataforma metálica utilizada para a realização do exercício intermitente de alta resistência tipo jump squat adaptada de Baraúna, et al., 2005.

Figura 3. Valores médios $\pm$ erro padrão das concentrações sanguíneas de lactato obtidas no repouso (Rep), imediatamente após a 1ª, 2ª e 3ª série de doze saltos e após o 3º, 5º e 7º minuto de recuperação (3º, 5º e 7ºmin, respectivamente). ^a $P < 0,001$ vs Rep, ^b $P < 0,05$ vs 1ª série, ^c $P < 0,001$ vs Rep e 1ª série, ^d $P < 0,05$ vs 2ª série; ^e $P < 0,001$ vs Rep, 1ª série e 2ª série, ^f $P < 0,05$ vs 3ª série; ^g $P < 0,001$ vs Rep, 1ª e 2ª séries, ^h $P < 0,05$ vs 3ª série; ⁱ $P < 0,001$ vs Rep, 1ª e 2ª séries, ^j $P < 0,05$ vs 3ª série.

Figura 4. Valores médios $\pm$ erro padrão das $[La^-]_{1a}$, $[La^-]_{2a}$ e $[La^-]_{3a}$ do treinamento intermitente de alta intensidade mensurados na primeira sessão (T1), após 15 (T2), 30 (T3) e 45 (T4) dias de treinamento. ^a $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{1a}$ (T1); ^b $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{2a}$ (T1), ^c $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{3a}$ (T1); ^d $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{1a}$ (T1), ^e $P = 0,004$ vs $[La^-]_{1a}$ (T2); ^f $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{2a}$ (T1); ^g $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{3a}$ (T1); ^h $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{1a}$ (T1), ⁱ $P = 0,03$ vs $[La^-]_{1a}$ (T2); ^j $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{2a}$ (T1), ^k $P = 0,02$ vs $[La^-]_{2a}$ (T2); ^m $P = 0,0002$ vs $[La^-]_{3a}$ (T1).

Figura 5. Valores de $[La^-]_{pico}$ mensurados na primeira sessão (T1), após 15 (T2), 30 (T3) e 45 (T4) dias de treinamento intermitente de alta intensidade. Valores expressos em milimoles por litro (mmol/L) como média $\pm$ EPM. * $P = 0,0002$ vs T1, ** $P = 0,0002$ vs T1, & $P = 0,0002$ vs T1; # $P = 0,004$ vs T2.

**O TREINAMENTO RESISTIDO REDUZ INFLAMAÇÃO EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO E MELHORA A SENSIBILIDADE À INSULINA PERIFÉRICA
EM RATOS OBESOS INDUZIDOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

**RESISTIVE TRAINING REDUCES INFLAMMATION IN SKELETAL MUSCLE
AND IMPROVES THE PERIPHERAL INSULIN SENSITIVITY IN OBESE
RATS INDUCED BY HYPERLIPIDIC DIET**

Ana Carolina Panveloski-Costa (1), Danilo Correa Pinto Junior (1), Bruna Brasil Brandão (1), Rafael Junges Moreira (1), Ubiratan Fabres Machado (2), Patricia Monteiro Seraphim (1)

1. Departamento de Fisioterapia, Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP – Campus Presidente Prudente
2. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo

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

RESUMO

Objetivos: Investigar em ratos obesos o efeito da prática de exercício resistido sobre a sensibilidade à insulina e sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de transportador de glicose em músculo solear. **Métodos:** Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica (grupos obesos) foram submetidos ao protocolo de exercício tipo *jump squat*. A sensibilidade à insulina e a expressão gênica de TNF- α , SOCS3 e GLUT4 foram comparadas entre os grupos obesos sedentários (OS) e exercitados (OE), controles sedentários (CS) e exercitados (CE). **Resultados:** A sensibilidade à insulina estava reduzida no grupo OS e elevada no OE. Os conteúdos de RNAm de TNF- α e de SOCS3 estavam aumentados no músculo esquelético do grupo OS e reduzidos no OE. O conteúdo protéico e de RNAm de GLUT4 não diferiu entre os grupos. **Conclusões:** O exercício resistido reverte o quadro de resistência à insulina periférica e de inflamação no músculo esquelético de obesos induzidos por dieta.

Descritores: dieta hiperlipídica, exercício resistido, sensibilidade à insulina, GLUT4, TNF- α e SOCS3

ABSTRACT

Objectives: To determine if resistive exercise protocol can modulate TNF- α , SOCS3 and glucose transporter GLUT4 genes expression in skeletal muscle, and peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet.

Methods: Wistar obese rats induced by hyperlipidic diet were subjected a resistive exercise protocol as jump squat. Insulin sensitivity and mRNA content of TNF- α , SOCS3 and GLUT4 were assayed and compared among the groups: obese sedentary (OS) and exercised (OE), sedentary controls (CS) and exercised (CE). **Results:** The mRNA content of TNF- α and SOCS3 has increased in skeletal muscle from OS and has decreased in OE group. The protein and GLUT4 mRNA contents were correlated but they did not change among the groups. Peripheral insulin sensitivity has increased in the OE compared to OS group. **Conclusions:** The resistive exercise reverses the peripheral insulin resistance and the inflammatory state in skeletal muscle from diet-induced obese rats.

Key Words: hyperlipidic diet, resistive exercise, insulin sensitivity, GLUT4, TNF- α and SOCS3

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Embora os mecanismos precisos que correlacionam a obesidade com a resistência à insulina e Diabetes Mellito tipo 2 ainda não estejam definidos, provavelmente se relacionam à produção de vários fatores derivados dos adipócitos que atuam no fígado, no músculo ou no próprio tecido adiposo, comprometendo a ação da insulina (1).

Em modelos de obesidade, a resistência à insulina está associada à redução da expressão de transportador de glicose (GLUT4) e/ou prejuízo na via de sinalização da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo (2), o que está associado a um quadro de inflamação subclínica característico da obesidade, resultante da maior circulação de fatores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) entre outros (3).

A relação entre o aumento da expressão de TNF- α e os prejuízos na sensibilidade à insulina no músculo esquelético já foi demonstrada em animais *in vitro* (4) e *in vivo* (5) e, em humanos *in vivo* (6). O TNF- α reduz a sinalização da insulina atuando em nível de proteínas da cascata de sinalização desse hormônio como o substrato do receptor de insulina (IRS-1), prejudicando a propagação do sinal da insulina para captação de glicose em tecidos insulino-sensíveis (7).

Além disso, o aumento da expressão de TNF- α pode levar à resistência à insulina por indução da expressão de proteína Supressora de Sinalização de Citocinas (SOCS) (8). A proteína SOCS é induzida por diversas citocinas, em vários tecidos, de maneira tecido- e citocina-específica.

Embora a SOCS seja uma proteína originalmente pertencente à via de sinalização de citocinas, foi mostrado recentemente que ela também pertence ao circuito de sinalização da insulina (9). Quando expressa, a SOCS3 localiza-se no citoplasma em condições basais. Após o tratamento com insulina, foi observado seu deslocamento para a membrana plasmática, onde pode interagir com o receptor da insulina, atuando negativamente na sinalização do hormônio (9).

O treinamento de resistido (TR), assim como o treinamento aeróbio, também está associado a redução do risco de doenças relacionadas a baixo grau de inflamação, tais como aterosclerose, obesidade e resistência à insulina (10).

O regulamento de adaptação do músculo esquelético ao exercício de resistido é orquestrada por uma complexa rede de cinases e fosfatases sujeitas a um elevado grau de regulação por retroalimentação, cruzamento de vias de sinalização e ativação transitória (11).

Em longo prazo, o TR pode diminuir os níveis basais de citocinas que desempenham papel negativo no metabolismo da glicose (12). No entanto, dados da literatura ainda não são conclusivos quanto ao efeito do exercício sobre as concentrações plasmáticas e músculo-esqueléticas de citocinas (13).

A maioria dos relatos dos efeitos do exercício na modulação de citocinas são provenientes de estudos envolvendo treinamento aeróbio (14,15). Em contraste, as provas sobre a relação entre exercício resistido e inflamação é mais limitada (16). As respostas fisiológicas e o padrão de citocinas liberadas pelo músculo frente ao exercício aeróbio são diferentes dos obtidos em exercício resistido (17).

A literatura aponta um efeito redutor na expressão de TNF- α em tecido muscular esquelético em resposta aguda (18) ou crônica (19) à atividade física resistida. No entanto, os efeitos do treinamento resistido (TR) no conteúdo de TNF- α dependem do compartimento onde a mensuração é realizada: no plasma ou no tecido muscular (proteína ou expressão de RNAm) (20).

Há estudos que mostram ausência de efeitos do TR sobre a concentração plasmática de TNF- α (21-23), enquanto um dos mesmos estudos relataram aumentos na expressão de RNAm desse gene (24). Por outro lado, redução na expressão de TNF- α em resposta ao TR tem sido relatada (19).

No entanto, estudos que avaliem o efeito do treinamento resistido na modulação de marcadores inflamatórios envolvidos no prejuízo da cascata de sinalização da insulina em tecido muscular esquelético são escassos na literatura. Nesse contexto, este estudo pretende identificar os efeitos que o exercício físico resistido exerce sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias em músculo esquelético solear envolvidas no prejuízo da sensibilidade à insulina decorrente da obesidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar com dois meses de idade (180-200g) provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus Botucatu foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação na UNESP do Campus de Presidente Prudente sob condições padronizadas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias).

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 15/2009.

Desenho Experimental:

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: controle sedentário (CS); controle exercitado (CE); obeso sedentário (OS); obeso exercitado (OE).

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 OS e OE foram alimentados com uma dieta hiperlipídica adaptada de Lamas et al., 2004 composta por: bacon, mortadela, salsicha, bolacha e 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 (25). O peso corpóreo (PC) dos animais foi registrado semanalmente.

Após dois meses de dieta de hiperlipídica, com quatro meses de idade, os animais dos grupos exercitados (CE e OE) foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido. Os animais passaram por uma semana de adaptação antes do início do protocolo de treinamento resistido e, os animais que resistiram à atividade foram distribuídos nos grupos sedentários (CS e OS). O treinamento resistido foi realizado seguindo o modelo de força proposto por Tetsuro Tamaki (26) com algumas adaptações. O aparelho foi projetado de maneira que o animal ficava imobilizado por um colete adaptado sobre uma

plataforma metálica. A estimulação elétrica foi realizada utilizando clipe metálico que envolvia a extremidade da cauda do animal ligado a um eletroestimulador tipo Dualpex 961, da Quarker, calibrado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Os parâmetros utilizados foram: frequência 1 Hz, duração de 0,3 s com intervalo de 2 s entre cada estimulação elétrica e, a intensidade foi ajustada de maneira que o animal executasse o movimento, variando de 3 a 6 mA. Esses parâmetros foram adotados por serem pulsos bidirecionais de média nula, não apresentando efeitos eletrolíticos, permitindo aplicações de longa duração sem risco de lesão dos tecidos.

Com esta estimulação o rato realizou o movimento de extensão completa da pata (joelho e tornozelo) levantando uma carga que era posicionada na parte posterior do colete. Os animais realizaram 3 séries de 12 repetições, 3 vezes por semana, durante 6 semanas. Foram realizadas 3 sessões de adaptação ao treinamento na primeira semana sem incremento de carga: 1, 2 e 3 séries de 12 repetições do primeiro ao terceiro dia respectivamente. Nas primeiras 2 semanas, os animais realizaram o treinamento sem incremento de carga. A partir da terceira semana, uma carga equivalente à 50% do PC foi imposta até o final do protocolo de treinamento resistido. A carga foi ajustada semanalmente de acordo com as variações do PC.

Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Para a avaliação da sensibilidade à insulina, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina “in vivo”. Neste teste foi

administrada insulina na dose 50 μ U / 100 g de peso corpóreo na veia peniana, e foi analisada a concentração de glicose sérica em diferentes tempos de coleta de sangue (0 – tempo basal a 16 minutos) após a administração da insulina.

Este teste foi realizado uma semana antes do sacrifício, sendo utilizados 4 ratos de cada grupo, os quais foram anestesiados com xilasina e quetamina (0,3 mg / Kg de peso corpóreo). A glicemia foi determinada por glicosímetro (Biocheck, Brasil).

Coleta do Material

Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos a 2 horas de jejum e foram sacrificados por meio de anestésico (mistura de xilasina e quetamina - 60 mg/ kg do peso corporal de cada componente) por via intraperitoneal. Em seguida foram retirados o músculo esquelético sóleo e o tecido adiposo branco periepididimal (TA).

Quantificação do RNA

O RNA total das amostras do músculo sóleo 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 através do cálculo da relação 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 realizado a

amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4 (sense 5' – CCCCTCCAGGGCAAAGGAT - 3', antisense: 5' - TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3'), da SOCS3 (Sense: 5'- CCTTTGAGGTTTCAGGAGCAG -3'; Antisense: 5'- GTAGCCACGTTGGAGGAGAG -3') e do TNF- α (Sense: 5'– AAGATGTCTCAGGCCTCC –3'; Antisense:5'- AGACAGCTTCCCAACGAT -3') através 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 software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para este fim. A expressão do RNAm para o gene Glut4 foi normalizada pela expressão da β -actina (sense 5'- ATGAAGATCCTGACG AGCGTG - 3' e antisense 5' – CTTGCTGATCCACA TCTGCTGG - 3'), calculada pela razão dos valores densitométricos de cada amostra para o gene Glut4 e o gene constitutivo.

Quantificação de proteínas

Para a técnica de Western Blotting foi realizado o processo de obtenção da fração de membranas totais (MT). Para isso o tecido muscular solear foi homogeneizado em tampão TRIS HCl 10mM; EDTA 1mM, sacarose 250mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN). Em seguida, foi submetido a uma centrifugação a 1.000g durante 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspensão em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1.000g) por 10

minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes foram somados e então submetidos à uma ultracentrifugação a 150.000g durante 75 minutos, a 4°C. O sedimento correspondente à fração de membranas totais (MT) foi ressuspenso em 600 µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização.

A concentração de proteína total da fração de membranas totais foi avaliada através do método de Lowry. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a concentração de proteína foi avaliada por leitura em espectrofotômetro (670 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,05 a 1,0 mg / mL. Os valores de concentração protéica das amostras de fração de membranas totais foram aferidos nesta curva de calibração.

A detecção das quantidades de proteínas GLUT4 no músculo sóleo foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, com a utilização de kit de quimiluminescência (ECL) para detecção das bandas. Resumidamente o método consistiu em: quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, separadas de acordo com o peso molecular em SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio com albumina sérica bovina em PBS 8% durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT4 (Chemicon) (diluição 1:3000 em PBS), durante 3 horas a 37°C. Posteriormente foi realizada uma incubação com os anticorpos secundários anti-IgG, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:10000, em solução bloqueadora BSA 1% durante 1 hora. As membranas foram lavadas vigorosamente com tampão PBS e colocadas em contato com 3mL de reagente de detecção n° 1 acrescidos de 3mL de reagente de detecção n°2 do kit ECLTM – Western Blotting Detection

Reagents (GEHealthcare, AMERSHAM Biosciences, UK) por 2 minutos e expostas a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 2, 4, 6 e 8 minutos para detecção das bandas resultantes. As bandas identificadas na autorradiografia foram quantificadas através de densitometria óptica pelo programa *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD). O anticorpo anti-GLUT4 utilizado foi obtido junto a Chemicon International, Temecula, Califórnia.

Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do programa InStat versão 3.01. Os valores são expressos em média e erro padrão da média (EPM). O teste Kolmogorov–Smirnov revelou que os resultados dos experimentos apresentam distribuição normal. A comparação entre os grupos foi realizada usando o teste ANOVA one-way com Post-hoc de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

RESULTADOS

Para induzir a obesidade nos animais foi ofertada uma dieta de hiperlipídica composta por alimentos hipercalóricos a partir do segundo mês de idade. A partir da terceira semana de ingestão da dieta hiperlipídica, pôde-se observar aumento significativo no peso dos animais que receberam a dieta e dos que não receberam (Fig. 1).

Inserir Fig 1

A Tabela 1 ilustra as características de composição corporal dos animais. Os valores apresentados na segunda coluna mostram que os animais sedentários submetidos à dieta de hiperlipídica (OS e OE) apresentaram aumento estatisticamente significativo na porcentagem de ganho de peso corpóreo ao longo do período de estudo, quando comparados aos grupos controles (CS e CE). No entanto, quando submetido ao protocolo de treinamento, o grupo OE apresentou redução neste valor comparado ao grupo OS, evidenciando a eficiência do treinamento resistido imposto. Além disso, verificou-se aumento expressivo da massa adiposa periepídimal nos animais submetidos à dieta hiperlipídica de 49% no grupo OS ($P<0,001$) e 42% no grupo OE ($P<0,01$), quando comparados aos grupos controles CS e CE, respectivamente. No entanto, quando submetido ao treinamento resistido (OE), o tecido adiposo periepídimal apresentou redução de 27% comparado ao grupo OS ($P<0,01$). Os valores de peso relativo de massa muscular solear não apresentaram diferenças entre os grupos.

Em relação à sensibilidade à insulina, observou-se que os ratos submetidos à dieta hiperlipídica por um período de quatro meses apresentaram redução na constante de decaimento da glicose (kITT) calculada (Tabela 1). Em contrapartida, o treinamento resistido imposto aumentou a resposta ao estímulo da insulina, indicando maior capacidade de depuração de glicose durante o ITT nos animais do grupo OE quando comparados aos animais do grupo OS ($P<0,01$).

Inserir Tabela 1.

Na Fig 2. são ilustrados os valores densitométricos em unidades arbitrárias (UA) referentes à expressão de RNAm de GLUT4, SOCS3 e TNF- α no músculo sóleo. A dieta hiperlipídica causou aumento de 26% ($P<0,05$) e de 33% ($P<0,001$) do conteúdo de RNAm de SOCS3 e TNF- α , respectivamente, no grupo OS quando comparado ao grupo CS. No entanto, quando submetidos ao treinamento resistido (OE), houve redução de 22% tanto na expressão de RNAm de SOCS3 ($P<0,05$) quanto de TNF- α ($P<0,05$) em relação ao grupo OS. O treinamento per se nos animais do grupo CE não alterou o conteúdo de RNAm desses genes em relação ao grupo CS. Embora não houvesse diferença estatística no conteúdo de RNAm do GLUT4, concomitantemente ao aumento na expressão de RNAm de SOCS3 e TNF- α , o grupo sedentário submetido à dieta hiperlipídica (OS) apresentou redução de aproximadamente 28% no conteúdo de RNAm de GLUT4. Em contrapartida, os animais do grupo OE apresentaram aumento de aproximadamente 33% no conteúdo de RNAm deste gene em relação ao grupo OS.

Inserir Fig 2.

Na Fig. 3, é apresentado o conteúdo de proteína GLUT4 expresso por grama de tecido. Embora não se observe diferença estatística entre os grupos, houve uma importante redução de aproximadamente 30% no grupo OS comparado aos demais grupos, o que se correlacionou com o conteúdo de

RNA_m. Já o grupo exercitado OE apresentou aumento de 36% no conteúdo de proteína GLUT4 no músculo sóleo em relação aos animais OS, indicando provável melhora na expressão desta proteína com a prática do exercício resistido.

Inserir Fig 3.

DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que a ingestão de dieta hipercalórica está associada à resistência à insulina em humanos (27) e em animais (28). Tal alteração decorre do aumento expressivo da massa adiposa que induz uma elevação da produção e liberação de proteínas que prejudicam a sinalização da insulina e a expressão de transportadores de glicose em tecidos insulino-sensíveis (2).

No presente estudo, observou-se aumento expressivo no peso corpóreo e no ganho de massa adiposa periepididimal dos animais submetidos à dieta hiperlipídica em relação aos animais que receberam dieta padrão. A partir destes resultados podemos inferir que a dieta hiperlipídica foi eficiente em gerar obesidade em ratos machos Wistar, que parece estar bem instalada na 12^ª semana, a partir da qual não se observou grande incorporação de massa corpórea ao longo de desenvolvimento dos animais, mas manteve-se maior até o final do estudo.

Diversos mecanismos adaptativos que regulam o metabolismo lipídico no músculo esquelético dão origem a condições metabólicas que parecem melhorar, ou, por outro lado, piorar a ação da insulina (29). De acordo com

essa afirmação, no presente estudo ocorreu redução na sensibilidade à insulina nos animais sedentários submetidos à dieta hiperlipídica durante 14 semanas (OS). Os eventos metabólicos que associam a exposição crônica à dieta hiperlipídica aos prejuízos na sinalização da insulina promovidos por serinas cinases, tais como, a proteína cinase C (PKC), a proteína cinase ativada por mitogênio p-38 (MAPK p-38), subunidade catalítica B da proteína cinase I κ B (IKK-B) e cinase c-Jun N-terminal (JNK) ainda não são precisos. Mas, uma teoria sugere que a resistência à insulina decorre de prejuízos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, e conseqüente acúmulo de metabólitos de lipídeos que ativam algumas cinases como a PKC e a JNK. Essas cinases, por sua vez, promovem transcrição de citocinas com efeitos pró-inflamatórios tal como o TNF- α (30).

Goodpaster e Kelley (2002) verificaram aumento na sensibilidade à insulina em tecidos musculares em indivíduos treinados associado a níveis elevados de triglicérides (TAG), tal como encontrado na obesidade ou no Diabetes Mellitus (31). Da mesma forma, tanto o estoque de TAG quanto a sensibilidade à insulina é maior em músculos com fibras predominantemente do tipo I, do que os que possuem mais fibras tipo II (31). Dessa forma, a capacidade oxidativa muscular mostra-se o melhor preditor da sensibilidade à insulina do que o conteúdo de TAG (32).

Estudos em animais roedores têm mostrado que a estimulação elétrica em músculos isolados com pulsos de baixa frequência por períodos prolongados (mimetizando treinamento aeróbio) (33) ou de alta frequência por curtos períodos (mimetizando treinamento anaeróbio) (34) ativa seletivamente

cascatas de sinalização associadas à biogênese mitocondrial, como por exemplo a proteína cinase ativada por AMP (AMPK).

Dessa forma, podemos inferir que a melhora da sensibilidade à insulina nos animais exercitados submetidos à dieta hiperlipídica do presente estudo, provavelmente esteja associada, em parte, à melhora da capacidade oxidativa muscular.

Yaspelkis et al. (35) observaram que os componentes da via pró-inflamatória são ativados em músculos esqueléticos de animais alimentados com dieta hipercalórica. Em concordância com essas observações, os achados do presente estudo mostram que a expressão de RNAm de SOCS3 e TNF- α aumentou em músculo esquelético oxidativo de ratos submetidos à dieta hiperlipídica (OS) de maneira significativa.

Uma das vias pela qual o TNF- α induz a resistência à insulina é o estímulo da lipólise no tecido adiposo, gerando aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres que eventualmente contribui para o desenvolvimento desse fenótipo resistente à insulina (36). Além disso, o TNF- α pode inibir o estímulo da insulina por meio da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) em serina (7). Adicionalmente, os efeitos da proteína SOCS3 na sensibilidade à insulina decorrem da sua co-localização nas subunidades beta do receptor de insulina (IR- β) e IRS-1 que resulta no impedimento da interação do IRS-1 com as IR- β , ocorrendo redução da atividade da PI3-kinase (9).

Os mecanismos moleculares que induzem a expressão da proteína SOCS3 em resposta à dieta hiperlipídica ainda não foram completamente esclarecidos. Normalmente a transcrição de SOCS3 por meio de citocinas é

induzida através da ativação dos fatores de transcrição da família de proteína ativadora da transcrição e sinalização da transdução (STAT) (37).

Recentemente, estudos mostram o efeito do exercício físico aeróbio agudo (38) ou crônico (15) na modulação de marcadores inflamatórios. Neto et al. (2009) observaram melhora da relação IL-10/TNF- α em tecidos musculares esqueléticos de ratos Wistar submetidos a uma sessão aguda de exercício físico exaustivo (38). E Yaspelkis observou redução de RNAm de SOCS3 associado ao aumento de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de insulina de animais obesos exercitados (15).

Estudos relacionados à modulação de citocinas no tecido muscular em resposta ao treinamento resistido ainda é escasso na literatura. Recentemente, Karagounis (2010) mostrou que o treinamento resistido realizado por intervalos de 48 horas entre cada sessão, promove redução do conteúdo de TNF- α no quadríceps de ratos treinados a 75% da RM após 24 e 48 horas da 5ª sessão de treinamento (39). No entanto, os efeitos do treinamento resistido sobre a expressão de SOCS3 muscular ainda não foram elucidados.

No presente estudo, a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no músculo solear foi acompanhada pela melhora da sensibilidade à insulina periférica nos animais submetidos ao treinamento resistido e à dieta hiperlipídica. Essa resposta ao treinamento resistido, provavelmente, foi promovida, por adaptações positivas na capacidade oxidativa do músculo sóleo e, dessa forma, pode ter aumentado a metabolização de lipídeos, que por sua vez, reduziu os fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias e melhorou sensibilidade à insulina (30).

Estudos na literatura mostram que a expressão da proteína GLUT4 tal como a translocação para a membrana plasmática induzida por estímulo de insulina são reduzidas pela dieta de alto teor de gordura (28, 29). Contrário a estas observações, no presente estudo a dieta hiperlipídica não surtiu efeito significativo na expressão de RNAm de GLUT4 e, nem no conteúdo protéico, porém se observou importante tendência à redução (30%) no grupo OS quando comparado ao CS. Esse achado foi similar ao encontrado por Brandt et al.(2010) no qual não houve alterações do conteúdo protéico da proteína transportadora de glicose no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à dieta hipercalórica (40).

Embora vários estudos mostrem aumento no conteúdo de GLUT4 após treinamento aeróbio, inesperadamente neste modelo de treinamento, não ocorreu aumento significativo de proteína GLUT4, porém, se observou forte tendência a um aumento apenas nos animais obesos treinados. Isso sugere que a eficiência na redução da massa adiposa após 6 semanas de treinamento resistido foi o suficiente para ativar mecanismos que possam contribuir para melhora da sensibilidade à insulina e que não se reflete em conteúdo de transportador glicose, tais como a ativação da AMPK, que por sua vez, aumenta a captação de glicose, e a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como evidenciado no presente estudo.

Apesar desta consideração, de maneira geral, em relação à modulação da expressão de GLUT4 na obesidade e no treinamento físico, observou-se estreita correlação entre conteúdos de RNAm e de proteína GLUT4, evidenciando regulação transcricional do gene desta proteína nos modelos estudados.

Portanto, a dieta de hiperlipídica foi eficiente para promover aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias locais, representadas pela SOCS3 e TNF- α , somada à redução da sensibilidade à insulina. E o treinamento resistido foi eficiente para promover redução da expressão dos marcadores inflamatórios locais e adequação na sensibilidade à insulina, com retorno a valores próximos dos animais dos grupos controles.

Conclui-se, portanto que a dieta hiperlipídica induz obesidade com ganho da massa adiposa e aumento de RNAm de marcadores inflamatórios na musculatura oxidativa. E o treinamento resistido nos animais obesos é eficaz para reverter as alterações tanto na expressão de RNAm de SOCS3 e TNF- α quanto na sensibilidade à insulina, o que não envolve modulação do conteúdo de RNAm e de proteína GLUT4.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):230-8.
2. 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.
3. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, et al. TNF- α downregulates iNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest.* 2006; 116(10):2791-8.
4. Zentella A, Manogue K, Cerami A. Cachectin/TNF α -mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine.* 1993; 5:436–47.
5. Furnsinn C, Neschen S, Wagner O, Roden M, Bisschop M, Waldhäusl W. Acute and chronic exposure to tumor necrosis factor- α fails to affect insulin-stimulated glucose metabolism of isolated rat soleus muscle. *Endocrinology.* 1997; 138 (7): 2674-79.
6. De Blaauw I, Eggermont AM, Deutz NE, de Vries M, Buurman WA, Von Meyenfeldt MF. TNF- α has no direct *in vivo* metabolic effect on human muscle. *Int J Cancer.* 1997; 71(2): 148-54.
7. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004; 279(17):17070–78.

8. Alexander WS, Hilton DJ. The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):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(21):15985-91.
10. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, 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.
11. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:1974–84.
12. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444:860-7
13. Nicklas BJ, Ambrosius W, Messier SP, Miller GD, Penninx BWJH, Loeser RF, Palla S, Bleecker E, Pahor M. Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(4):544-51.
14. Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin Chim Acta.* 2010; 411:785-93.
15. Yaspelkis BB, Kvasha I, Lessard S, Rivas D, Hawley J. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signalling in rat skeletal muscle. *Eur J App Physiol.* 2010; 110(4): 779-88.
16. Bloomer RJ. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Med.* 2007; 37:519-32.

17. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 2007;37:737-63.
18. Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R.L., Osada, T., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 283: E1272–E1278, 2002.
19. Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor α in frail elderly humans. *FASEB J.* 2002; 15: 475-82.
20. Calle MC, Fernandez ML, Kraemer WJ, Volk BM, Kupchak B, Volek JS. Resistance training improves the inflammatory response to an acute resistance exercise bout in healthy young adults. *FASEB J.* 2010; 24:743.2.
21. Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, Timmerman KL, McFarlin BK, Coen PM, Talbert E. The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39:1714-19.
22. de Salles BF, Simão R, Fleck SJ, Dias I, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. Effects of resistance training on cytokines. *Int J Sports Med.* 2010; 31:441-50.
23. Nieman DC, Davis JM, Brown VA, Henson DA, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Downs MF, Smith JC, Carson J, Brown A, McAnulty SR, McAnulty LS. Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. *J Appl Physiol.* 2004; 96:1292-8.
24. Kirwan JP, Del Aguila LF. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:1281-5.

25. Lamas O, Martínez JA, Marti A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. *J Nutr Biochem.* 2004; 15(7): 418-25.
26. Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1992; 24(8):881-6.
27. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997;46(1):3-10.
28. Lessard SJ, Rivas DA, Chen Z-P, Bonen A, Febbraio MA, Reeder DW, et al. Tissue-Specific Effects of Rosiglitazone and Exercise in the Treatment of Lipid-Induced Insulin Resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1856-64.
29. Yaspelkis BB, Lessard SJ, Reeder DW, Limon JJ, Saito M, Rivas DA, et al. Exercise reverses high-fat diet-induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(4):941-9.
30. Silveira LR, Fiamoncini J., Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CHJ, Lopes LR, Curi R. Updating the Effects of Fatty Acids on Skeletal Muscle. *J Cell Physiol.* 2008; 217: 1-12.
31. Goodpaster BH, Kelley DE. Skeletal muscle trygliceride: marker or mediator of obesity-induced insulin resistance in type 2 diabetes mellitus? *Curr Diab Rep.* 2002; 2:216-22.
32. Bruce CR, Anderson MJ, Carey AI, Newman DG, Bonen A, Kriketos AD. Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5444-51.

33. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J*. 2005; 19: 786–788.
34. Gibala M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009; 34: 428–32.
35. Yaspelkis BB, Kvasha IA, Figueroa TY. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /IKK β phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296(6):1709-15.
36. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2007; 48:751-62.
37. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS3 Inhibits Insulin Signaling and Is Up-regulated in Response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. *J Biol Chem*. 2001; 276(51):47944-9.
38. Rosa Neto JC, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Batista Jr ML, Nascimento CMO, Seelaender M. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 106:697–704.
39. Karagounis LG, Yaspelkis BB, Reeder DW, Lancaster GI, Hawley JA, Coffey VG. Contraction-induced changes in TNF- α and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2010; 109:839–848.

40. Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 August 1, 2010;299(2):E215-24.

TABELA

Tabela 1. Composição Corporal e Constante de decaimento da Glicemia (kITT)

Grupos	% de Peso Corpóreo	Peso relativo do TA	Peso relativo do M. Sóleo	kITT
CS	192±7,54	10,6±0,91 (10 ⁻³)	0,46±0,02 (10 ⁻³)	5,76 ± 0,36
CE	163±3,76	8,79±0,67 (10 ⁻³)	0,56±0,03 (10 ⁻³)	6,63 ± 0,45
OS	283±12,0**	20,83±0,17 (10 ⁻³)**	0,44±0,59 (10 ⁻³)	3,60 ± 0,62 * %
OE	250±6,43* &	15,21±0,75 (10 ⁻³)&*	0,48±0,21 (10 ⁻³)	7,07 ± 0,47 ^θ

Tabela 1. Porcentagem de Ganho do Peso Corpóreo ao longo do tratamento expresso em percentual (% de Peso Corpóreo); Peso Relativo do Tecido Adiposo Periepididimal (Peso Relativo do TA) e Peso Relativo do Músculo Sóleo (Peso Relativo do M. Sóleo) expressos em g de tecido / g de Peso Corpóreo; Constante de decaimento da glicemia (kITT) expressa em percentual de decaimento da glicemia por minuto. Valores expressos como média ± EPM (n= 7 a 10 animais por grupo). Símbolos estatísticos: % de Peso Corpóreo: * $P<0,001$ vs CS e CE, * $P<0,05$, vs OS; & $P<0,001$ vs CS e CE; Peso do Tecido Adiposo Periepididimal: ** $P<0,001$ vs CS e CE; & $P<0,05$ vs OS e CS, * $P<0,01$ vs CE; kITT: * $P<0,05$ vs CS, % $P<0,01$ vs CE; ^θ $P<0,001$ vs OS. Grupos experimentais: controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE)

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1- Gráfico representativo da evolução do peso corpóreo nos grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em gramas (g) como média $\pm$ EPM (n=7 a 10 animais por grupo). Na abscissa, o “INICIO” representa o tempo inicial da oferta da dieta de cafeteria. * $P < 0,01$, vs OS e OE. No tempo SEM 6, ** $P < 0,001$ vs CS e CE; SEM 9, ** $P < 0,001$ vs CS e CE; SEM 12, * $P < 0,05$ vs OS; SEM 15, ** $P < 0,001$ vs CE e CS; FIM, , ** $P < 0,001$ vs CE e CS.

Figura 2- Gráfico representativo do conteúdo de RNAm do GLUT4, SOCS3 e TNF- α corrigidos pelo RNAm de β -actina obtidos em ensaios de RT-PCR no tecido muscular solear dos grupos controle (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em unidades arbitrárias (UA) como média $\pm$ EPM (n=7 a 10 animais por grupo). SOCS3: * $P < 0,05$ vs CS e CE, # $P < 0,05$ vs OS, TNF- α : ** $P < 0,001$ vs CS; * $P < 0,05$ vs OS.

Figura 3- Gráfico representativo do Conteúdo total de proteína GLUT4 por grama de tecido obtido em ensaio de Western blotting. Grupos: controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), obeso sedentário (OS) e obeso exercitado (OE). Valores expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/ g de tecido) como média $\pm$ EPM (n=7 a 10 animais por grupo em diferentes ensaios experimentais).

FIGURAS

Figura 1.

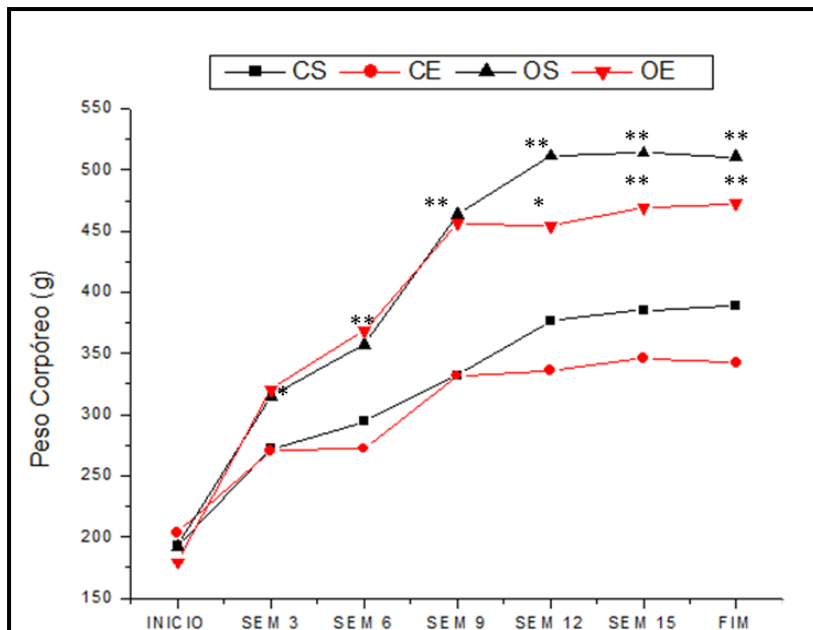


Figura 2.

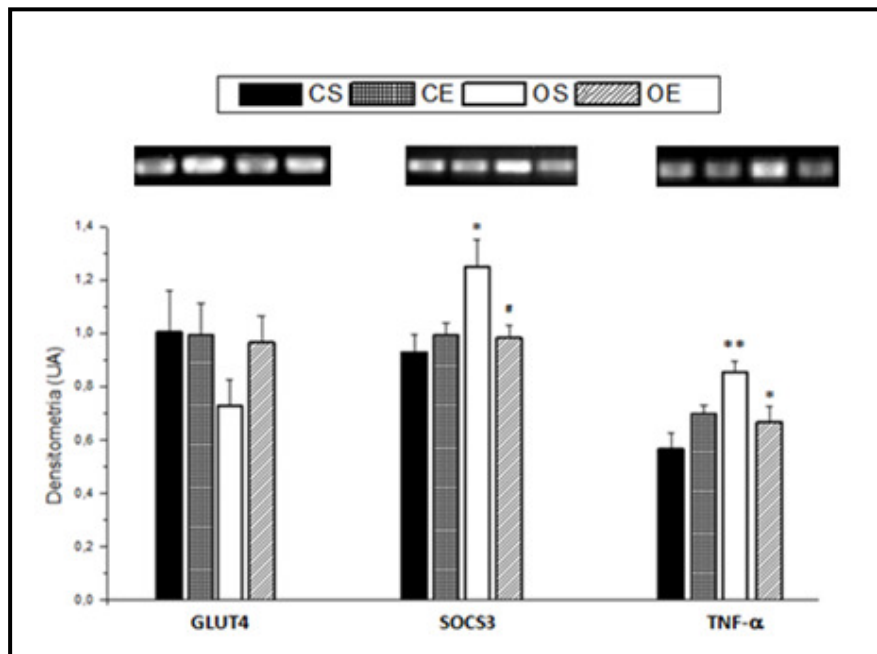
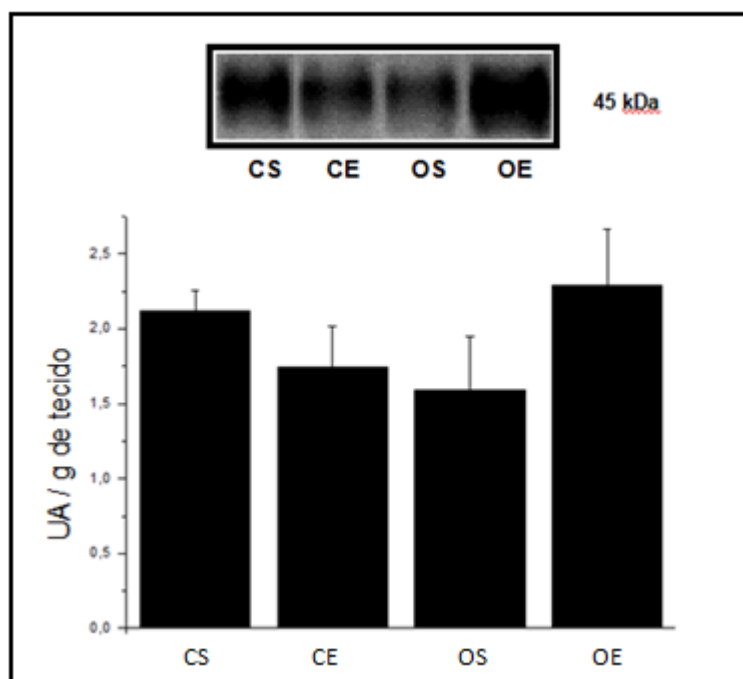


Figura 3.

A partir dessa dissertação pode-se concluir que o treinamento físico realizado tanto com predomínio do metabolismo oxidativo quanto do glicolítico promovem alterações metabólicas que culminam em melhora da sensibilidade à insulina. Tal alteração decorre principalmente de adaptações no metabolismo músculo esquelético às repetidas e sistemáticas contrações musculares, as quais promovem redução do quadro inflamatório muscular observado durante a obesidade.

1. Muoio DM, Koves TR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1a: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 874-83.
2. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 2002; 12:65-71.
3. Goodpaster BH, Kelley DE. Role of muscle in trygliceride metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 231-36.
4. Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudeck RW, Thompson RP, Pories WJ, et al. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:41-47.
5. Carnevali JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(4): 419-25.
6. Silveira LR, Fiamoncini J., Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CHJ, Lopes LR, Curi R. Updating the Effects of Fatty Acids on Skeletal Muscle. *J Cell Physiol. J Cell Physiol* 2008; 217: 1-11.
7. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-76.
8. Yu C, hen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphate-dylinositol 3-kinase activity in mucle. *J Biol Chem* 2002; 277.
9. Ribeiro-Filho FF, Mariosa SF, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 230-38.

10. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. *J Biol Chem* 2001; 276(51):47944-49.
11. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 15985-91.
12. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5755-61.
13. Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol* 2003; 88:99-107.
14. Astrup A. Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. *Public Health Nutr* 2001; 4:499-515.
15. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* 2005; 19: 786–788.
16. Gibala, M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009; 34: 428–32.
17. Vassilakopoulos T, Karatza MH, Katsaounou P, Kollintza A, Zakynthinos S, Roussos C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol* 2003;94: 1025-32.

18. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E, Febbraio M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: Is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc* 2004; 63:263-7.
19. Cases N, Aguiló A, Tauler P, Sureda A, Llompart I, Pons A, Tur JA. Differential response of plasma and immune cell's vitamin E levels to physical activity and antioxidant vitamin supplementation. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:781-8.
20. Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin Chim Acta* 2010;411:785-93.
21. Bloomer RJ. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Med* 2007;37:519-32.
22. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med* 2007; 37:737-63.
23. Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FGS, Sauers SE, Goodpaster BH. Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance:the athlete's paradox revisited*Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E882–E888, 2008.
24. Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:520258.
25. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 2009;30:592-602.
26. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1295-7.

ANEXO I:

Instruções aos autores – Revista Brasileira de Medicina do Esporte

<http://www.scielo.br/revistas/rbme/pinstruc.htm>

A **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** (RBME) é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte (SBME), com publicação bimestral. A missão da RBME é disseminar a produção científica nas áreas de ciências do exercício e do esporte, através da publicação de resultados de pesquisas originais e de outras formas de documentos que contribuam para o conhecimento fundamental e aplicado em atividade física, exercício e esporte no âmbito das ciências biológicas e da medicina.

Serão considerados para publicação artigos originais, artigos de opinião, artigos de revisão, relatos de experiência, relatos de casos ou cartas ao editor, sobre assuntos relacionados com as áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. Ser membro da SBME não representa um pré-requisito para publicação na RBME, nem influencia a decisão do Conselho Editorial. Serão aceitos artigos escritos na língua portuguesa e, a critério do Conselho Editorial, autores e grupos estrangeiros poderão publicar artigos escritos em inglês. Todos os artigos serão publicados na íntegra em português e em inglês, com resumos também em espanhol, sendo responsabilidade da RBME a produção das versões estrangeiras. A RBME adota as regras de preparação de manuscritos da *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (International Committee of Medical Journal

DUPLA SUBMISSÃO

Os artigos submetidos à RBME serão considerados para publicação somente com a condição de que não tenham sido publicados ou estejam em processo de avaliação para publicação em outro periódico, seja na sua versão integral ou em parte. A RBME não considerará para publicação artigos cujos dados tenham sido disponibilizados na Internet para acesso público.

Se houver no artigo submetido algum material em figuras ou tabelas já publicado em outro local, a submissão do artigo deverá ser acompanhada de cópia do material original e da permissão por escrito para reprodução do material.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores deverão explicitar, através de formulário próprio (Divulgação de potencial conflito de interesses - a seguir), qualquer potencial conflito de interesse relacionado ao artigo submetido, conforme determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 102/ 2000) e do Conselho Federal de Medicina (Resolução nº 1.595/2000). Esta exigência visa informar os editores, revisores e leitores sobre relações profissionais e/ou financeiras (como patrocínios e participação societária) com agentes financeiros relacionados aos produtos farmacêuticos ou equipamentos

envolvidos no trabalho, os quais podem teoricamente influenciar as interpretações e conclusões do mesmo. A existência ou não de conflito de interesse declarado estarão ao final de todos os artigos publicados.

BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM SERES HUMANOS

A realização de experimentos envolvendo seres humanos deve seguir a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº 196/96) disponível na internet (<http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso196de96.doc>), incluindo a assinatura de um termo de consentimento informado e a proteção da privacidade dos voluntários.

BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM ANIMAIS

A realização de experimentos envolvendo animais deve seguir resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

ENSAIOS CLÍNICOS

Os artigos contendo resultados de ensaios clínicos deverão disponibilizar todas as informações necessárias à sua adequada avaliação, conforme previamente estabelecido. Os autores deverão referir-se ao "CONSORT" (www.consortstatement.org).

REVISÃO PELOS PARES

Todos os artigos submetidos serão avaliados por ao menos dois revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do trabalho e que emitirão parecer fundamentado, os quais serão utilizados pelos Editores para decidir sobre a aceitação do mesmo. Os critérios de avaliação dos artigos incluem: originalidade, contribuição para corpo de conhecimento da área, adequação metodológica, clareza e atualidade. Os artigos aceitos para publicação poderão sofrer revisões editoriais para facilitar sua clareza e entendimento sem alterar seu conteúdo.

CORREÇÃO DE PROVAS GRÁFICAS

Logo que prontas, as provas gráficas em formato eletrônico serão enviadas, por e-mail, para o autor responsável pelo artigo. Os autores deverão devolver a prova gráfica com as devidas correções em, no máximo, 48 horas após o seu recebimento.

DIREITOS AUTORAIS

Todas as declarações publicadas nos artigos são de inteira responsabilidade dos autores. Entretanto, todo material publicado torna-se propriedade da Editora, que passa a reservar os direitos autorais. Portanto, nenhum material publicado na RBME poderá ser reproduzido sem a permissão por escrito da Editora. Todos os autores de artigos submetidos à RBME deverão assinar um Termo de Transferência de Direitos Autorais (a seguir), que entrará em vigor a

partir da data de aceite do trabalho. O autor responsável pelo artigo receberá, sem custos, a separata eletrônica da publicação (em formato PDF).

INSTRUÇÕES PARA ENVIO

Todos os artigos deverão ser submetidos diretamente em nosso site (www.rbme.org.br) e não deverão ultrapassar 20 páginas em seu total. Após submissão eletrônica do artigo, os autores deverão enviar, por correio: * Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses (conforme modelo a seguir).

* Termo

de Transferência de Direitos Autorais (conforme modelo a seguir). O artigo submetido deve ser digitado em espaço duplo, papel tamanho A4, com margens de 2,5 cm e espaço 1,5, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no

canto superior direito; as legendas das figuras e as tabelas devem vir ao final do texto, no mesmo arquivo. Figuras devem ser incluídas em arquivos individuais. Os manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao

estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

FORMATO DOS ARQUIVOS

- Para o texto, usar editor de texto do tipo Microsoft Word para Windows ou equivalente
- As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif.
- Forma e preparação de manuscritos

ARTIGO ORIGINAL

Um artigo original deve conter no máximo 20 (vinte) páginas conforme formatação acima (incluindo referências, figuras e tabelas) e ser estruturado com os seguintes itens, cada um começando por uma página diferente:

- **Página título:** deve conter (1) o título do artigo, que deve ser objetivo, mas informativo; (2) nomes completos dos autores; instituição(ões) de origem, com cidade, estado e país, se fora do Brasil; (3) nome do autor correspondente, com endereço completo e e-mail.
- **Resumo:** deve conter (1) o resumo em português, com não mais do que 300

palavras, estruturado de forma a conter: introdução e objetivo, métodos, resultados e

conclusão; (2) três a cinco palavras-chave, que não constem no título do artigo. Usar

obrigatoriamente termos do Medical Subject Headings, do Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) (3) o resumo em inglês (abstract), representando a

tradução do resumo para a língua inglesa (4) três a cinco palavras-chave em inglês

(keywords).

- **Introdução:** deve conter (1) justificativa objetiva para o estudo, com referências pertinentes ao assunto, sem realizar uma revisão extensa; (2) objetivo do artigo.

- **Métodos:** deve conter (1) descrição clara da amostra utilizada; (2) termo de consentimento para estudos experimentais envolvendo humanos; (3) identificação dos métodos, aparelhos (fabricantes e endereço entre parênteses) e procedimentos utilizados de modo suficientemente detalhado, de forma a permitir a reprodução dos resultados pelos leitores; (4) descrição breve e referências de métodos publicados mas não amplamente conhecidos; (5) descrição de métodos novos ou modificados; (6) quando pertinente, incluir a análise estatística utilizada, bem como os programas utilizados. No texto, números menores que 10 são escritos por extenso, enquanto que números de 10 em diante são expressos em algarismos arábicos.
- **Resultados:** deve conter (1) apresentação dos resultados em sequência lógica, em forma de texto, tabelas e ilustrações; evitar repetição excessiva de dados em tabelas ou ilustrações e no texto; (2) enfatizar somente observações importantes.
- **Discussão:** deve conter (1) ênfase nos aspectos originais e importantes do estudo, evitando repetir em detalhes dados já apresentados na Introdução e nos Resultados; (2) relevância e limitações dos achados, confrontando com os dados da literatura, incluindo implicações para futuros estudos; (3) ligação das conclusões com os objetivos do estudo; (4) conclusões que podem ser tiradas a partir do estudo; recomendações podem ser incluídas, quando relevantes.
- **Agradecimentos:** deve conter (1) contribuições que justificam agradecimentos, mas não autoria; (2) fontes de financiamento e apoio de uma forma geral.
- **Referências:** as referências bibliográficas devem ser numeradas na sequência em que aparecem no texto. As referências citadas somente em legendas de tabelas ou figuras devem ser numeradas de acordo com uma sequência estabelecida pela primeira menção da tabela ou da figura no texto.

O estilo das referências bibliográficas deve seguir as regras do Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47; <http://www.icmje.org>). Alguns exemplos mais comuns são mostrados abaixo. Para os

casos não mostrados aqui, consultar a referência acima. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>). Se o periódico não constar dessa lista, colocar o nome por extenso. Deve-se evitar utilizar "comunicações pessoais" ou "observações não publicadas" como referências. Um resumo apresentado deve ser utilizado somente se for a única fonte de informação.

Exemplos:

1) Artigo padrão em periódico (deve-se listar todos os autores; se o número ultrapassar seis, colocar os seis primeiros, seguidos por et al): You CH, Lee KY, Chey RY, Mrnguy R. Electrocardiographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980;79:311-4.

Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, Farrall M, James LA, Lai LY, et al. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352-5.

2) Autor institucional: The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

3) Livro com autor(es) responsáveis por todo o conteúdo: Colson JH, Armour WJ. Sports injuries and their treatment. 2 nd rev. ed. London: S. Paul, 1986.

4) Livro com editor(es) como autor(es): Diener HC, Wilkinson M, editors. Druginduced headache. New York: Springer-Verlag, 1988.

5) Capítulo de livro: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Pathologic physiology:

mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974;457-72.

TABELAS

As tabelas devem ser elaboradas em espaço 1,5, devendo ser planejadas para ter como largura uma (8,7cm) ou duas colunas (18cm). Cada tabela deve possuir um título sucinto; itens explicativos devem estar ao pé da tabela. A tabela deve conter médias e medidas de dispersão (DP, EPM, etc.), não devendo conter casas decimais irrelevantes. As abreviaturas devem estar de acordo com as utilizadas no texto e nas figuras. Os códigos de identificação de itens da tabela devem estar listados na ordem de surgimento no sentido horizontal e devem ser identificados pelos símbolos padrão.

FIGURAS

Serão aceitas fotos ou figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas poderão ser publicadas quando forem essenciais para o conteúdo científico do artigo. Nestes casos, os custos serão arcados pelos autores. Para detalhes sobre ilustrações coloridas, solicitamos contactar diretamente a Editora Redprint (redprint@uol.com.br). Figuras coloridas poderão ser incluídas na versão eletrônica do artigo sem custo adicional para os autores. Os desenhos das figuras devem ser consistentes e tão simples quanto possível. Não utilizar tons de cinza. Todas as linhas devem ser sólidas. Para gráficos de barra, por exemplo, utilizar barras brancas, pretas, com linhas diagonais nas duas direções, linhas em xadrez, linhas horizontais e verticais. A RBME desestimula fortemente o envio de fotografias de equipamentos e animais. As figuras devem ser impressas com bom contraste e largura de uma coluna (8,7cm) no total. Utilizar fontes de no mínimo 10 pontos para letras, números e símbolos, com espaçamento e alinhamento adequados. Quando a figura representar uma radiografia ou fotografia sugerimos incluir a escala de tamanho quando pertinente.

Envio de manuscritos

Os autores devem enviar:

- Carta de encaminhamento assinada por todos os autores ou pelo primeiro autor em nome dos demais, contendo: 1) informação a respeito de submissão prévia ou dupla ou submissão de qualquer parte do trabalho atual; 2) uma declaração de relações, financeiras ou não, que

possam levar a conflito de interesse; 3) uma declaração de que o trabalho foi lido e aprovado por todos os coautores e que os critérios necessários para a declaração de autoria (consultar *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*) foram alcançados por todos os autores e que cada autor afirma que os dados do manuscrito são verdadeiros; 4) o nome, endereço telefone e e-mail do autor para correspondência, que será o responsável em comunicar-se com os outros autores a respeito de revisões e provas gráficas. A carta deverá dar outras informações úteis ao Editor, como a sessão a que o artigo está sendo submetido.

- Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses (conforme modelo a seguir). Termo de Transferência de Direitos Autorais (conforme modelo a seguir).
- Três cópias do artigo, digitadas em espaço duplo, impressas em papel tamanho A4 ou ofício em somente um dos lados, com margens de 2,5 cm e espaço 1,5, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito; as legendas das figuras, as figuras propriamente ditas e as tabelas devem vir ao final anexas a cada cópia; assinalar no texto os locais adequados para inserção das figuras e tabelas.
- Um disquete 3,5 polegadas de alta densidade ou CD contendo somente um arquivo de texto, correspondente ao artigo, e os arquivos correspondentes a fotos ou figuras.
- Os manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

PREPARO DO DISQUETE

- Disquete formatado compatível com IBM/PC
- Usar editor de texto (Microsoft Word para Windows ou equivalente)
- O arquivo de texto deve conter somente o texto, da página-título até as referências, e as tabelas
- As figuras não devem ser incluídas no mesmo arquivo do texto
- Certificar-se de colocar no disquete a última versão do artigo, idêntica à versão impressa
- Etiquetar o disquete informando o programa e a versão utilizados, bem como o nome do arquivo.

ENVIO DE ARTIGOS POR E-MAIL

A RBME estimula a submissão de artigos através de correio eletrônico (email). Este tipo de submissão permite maior agilidade no processo de revisão. Para isso, será necessário o envio dos arquivos contendo o texto e as figuras do artigo para o endereço eletrônico da revista (revista@medicinadoesporte.com.br). Deverá ser enviada uma mensagem ao Editor-Chefe com identificação dos autores, bem como os seus endereços convencional e eletrônico, mais informações sobre o formato utilizado. O artigo deverá ser enviado em anexo (como attachment), nos formatos MS Word para Windows, respeitando rigorosamente as normas abaixo. As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif.

ANEXO 2.

Instruções aos autores – Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology.

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Types of paper

The CBP journals publish original articles and review articles. Before writing their manuscripts, potential authors of review articles should contact one of the Editors who, after consultations with the other editor and/or members of the Editorial Board, will provide feedback on suitability of the topic. Reviews should be topical, and serve as critical appraisals of areas of research. They should provide an up-to-date analysis of concepts and point out future directions.

Manuscripts are to be submitted to the CBP Editorial Office electronically at <http://gemini.econ.umd.edu/cbp>. After registration, authors are asked to upload their article and associated artwork, preferably in a single file. If necessary, the CBP Editorial Office will generate a PDF file to be used for the reviewing process.

Full instructions on how to use the online submission tool will be available at the above web address or can be requested by e-mail from the CBP Editorial Office (CBPjrnI@interchange.UBC.ca). During the submission process, authors are asked to select an appropriate section of CBP and to provide names and address (including e-mail) of at least five researchers of recognized competence who may be considered as reviewers.

Page charges

This journal has no page charges.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans*

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments*

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals
<http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue

will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see ➞ <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult ➞ <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult ➞ <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit ➞ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have

entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Patient details

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to

justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article

structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2,...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

If submitting a Review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words.

Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

As only one figure caption is used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not

use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Follow the relevant examples below.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

ANEXO 3.

Instruções aos Autores – Revista Brasileira de Endocrinologia & Metabologia

Objetivo e política editorial

A revista **ABE&M** aceita contribuições em Endocrinologia Clínica e Básica e ciências afins, nas seguintes categorias: (1) Artigo Original, (2) Artigo de Revisão, (3) Apresentação de Caso Clínico, (4) Caso Especial, (5) Perspectiva, (6) Controvérsias, (7) Memórias, (8) Editoriais e (8) Cartas ao Editor.

Os manuscritos (MS) devem ser redigidos em português ou inglês e estar de acordo com as instruções do Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas – International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), também conhecido como Normas de Vancouver.

Autoria

Todas as pessoas designadas como autores devem responder pela autoria do MS e ter participado suficientemente do trabalho para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo. O crédito de autoria deve ser baseado apenas por contribuições substanciais durante: (i) concepção, planejamento, execução, análise e interpretação dos resultados, (ii) redação ou revisão do MS de forma intelectualmente importante, e (iii) aprovação final da versão a ser publicada. A participação limitada à obtenção de fundos, coleta de dados, supervisão geral ou chefia de um grupo de pesquisa não justifica autoria.

Os Editores podem solicitar justificativa para a inclusão de autores durante o processo de revisão, especialmente se o total de autores exceder a seis. Os autores devem explicitar se há ou não potencial conflito de interesse, informação que deve ser incluída na seção Agradecimentos.

Os conceitos e os fundamentos epistemológicos, os dados, as experiências, as fontes de pesquisa e as conclusões emitidos nos trabalhos assinados são da inteira responsabilidade do(s) seu(s) autor(es). Os trabalhos submetidos ao ABE&M serão passíveis de revisão lingüística por revisores e relatores qualificados pelo Conselho Editorial, sem perda do crédito de autoria e do vínculo de responsabilidade do autor em relação à obra de criação intelectual.

Submissão dos artigos

A partir de 1 de janeiro de 2009, toda submissão de manuscrito (MS) deverá ser realizada por meio eletrônico através do endereço <http://www.abem-sbem.org.br>. O MS deve estar em formato Word (arquivo.doc) com opção de inclusão de arquivos suplementares. Todo artigo deve destinar-se

exclusivamente para a revista ABE&M.

Processo de avaliação

Todos os MS submetidos aos ABE&M que estiverem de acordo com as “Instruções para Autores” e com a política editorial da revista, são analisados pelo Conselho Editorial para avaliar seu mérito e adequação científica. Aprovados nesta fase, o MS é encaminhado aos avaliadores de reconhecida competência no assunto para seu parecer (*peer review*), cujo anonimato é garantido durante todo o processo de julgamento. A decisão final sobre a aceitação ou rejeição do MS é tomada pelos Editores

Manuscritos aceitos

Todo o MS publicado torna-se propriedade da revista “Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia” e não poderá ser reproduzido, republicado ou divulgado por meio eletrônico sem autorização. Os autores após a aceitação do seu artigo para publicação, transferem implicitamente seus direitos aos ABE&M.

Por razões editoriais, os Editores reservam-se o direito de proceder a pequenas modificações gráficas ou redacionais no texto, sem interferir em seu conteúdo.

Elaboração dos Manuscritos

1. ARTIGO ORIGINAL

É uma contribuição científica destinada a divulgar resultados de pesquisa original que não tenha sido publicada ou submetida em outros meios de divulgação. O MS deve ser digitado em espaço duplo, formatado em papel carta (216 x 279 mm) ou A4 (212 x 297 mm) com pelo menos 2,5 cm de margens de cada lado. Cada uma das seguintes seções deve ser iniciada em uma nova página: (A) Página título, (B) Resumo e Descritores, (C) Abstract (resumo em inglês) e Keywords, (D) Texto completo, (E) Agradecimentos, (F) Referências, (G) Tabelas (cada uma com título e rodapé), (H) Legendas das figuras e (I) Figuras. As páginas devem ser numeradas consecutivamente começando com a página título.

A. Página Título

Deve conter: (a) título do MS (em português e inglês), (b) nome e filiação institucional de todos os autores, (c) nome do(s) Serviço(s) e/ou Departamento(s) e Instituição(ões) onde o trabalho foi realizado, (d) nome e endereço completo (incluindo e-mail) do(a) autor(a) responsável pela correspondência, (e) “título abreviado”, com até 40 caracteres (incluindo espaços entre palavras).

B/C. Resumo e *Abstract*

A segunda página deve conter um Resumo semi-estruturado do trabalho (contendo: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões), com até 150 palavras.

Em página separada, apresentar o *Abstract*, que deve ser a tradução fiel do resumo para o idioma inglês.

Ao final do Resumo e do *Abstract* devem ser fornecidos 4 a 6 descritores do MS (e *keywords* correspondentes), para facilitar sua indexação posterior.

Estes descritores devem estar de acordo com os padrões do Index Medicus, que podem ser consultados no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>.

D. Texto

Deve ser dividido nas seguintes seções: (I) Introdução, (II) Métodos, (III) Resultados e (IV) Discussão.

I. Introdução: deve conter o propósito do trabalho, resumando os motivos do estudo e relevância científica. A revisão do assunto deve ser sucinta e evitar a inclusão de resultados ou conclusões do estudo a ser apresentado.

II. Métodos: deve conter uma descrição do modelo experimental empregado (pacientes ou animais de laboratório) com indicação de que o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital ou Instituição de Pesquisa onde o estudo foi realizado, seguindo a Declaração de Helsinque e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

Descrição dos métodos empregados citando os principais aparelhos e equipamentos utilizados (nome do fabricante e/ou origem do material entre parênteses) com detalhes técnicos suficientes dos procedimentos que possam permitir a reprodução do estudo apresentado. Métodos amplamente estabelecidos podem ser citados através de referências. Os métodos estatísticos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a verificação dos resultados àqueles que tiverem acesso.

III. Resultados: devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, evitando repetir dados apresentados em tabelas ou figuras; somente as observações importantes devem ser enfatizadas.

Unidades de Medidas – As medidas e as respectivas abreviaturas devem obedecer a Unidade do Sistema Internacional (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units>). As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser relatadas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais; temperaturas em graus centígrados (°C); pressão arterial em milímetro de mercúrio (mmHg) e os valores hematimétricos e químicos devem ser fornecidos no sistema métrico

tradicional.

IV. Discussão: deve comentar os aspectos novos e importantes obtidos do estudo em relação ao acervo da literatura disponível. Ainda nessa seção devem-se focalizar as conclusões obtidas. Evitar repetir resultados ou informações já apresentadas em outras seções. Deve-se ressaltar as implicações dos achados, suas limitações e mesmo recomendações para estudos futuros.

E. Agradecimentos

Em nova página, incluir: (i) contribuições que necessitem agradecimentos, mas não justifiquem autoria, (ii) agradecimentos a auxílio técnico, financeiro e material, incluindo auxílio governamental e/ou de laboratórios farmacêuticos, e (iii) Conflito de Interesse (inclusão obrigatória): descrever as colaborações financeiras que possam representar potencial conflito de interesse e/ou declarar a inexistência de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico.

F. Referências (máximo de 40 para artigo original)

Devem ser numeradas consecutivamente em ordem de aparecimento no texto e identificadas por numerais arábicos entre parênteses, conforme o exemplo: “Houve uma atualização da medicina molecular (3), seguida de avanços na área de genética aplicada (4-6), que ...”.

Quando houver referências em tabelas e figuras deverá obedecer à ordem correspondente à localização onde as tabelas e figuras estão mencionadas no texto.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus e seguindo o formato de citação recomendado pelo ICMJE.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do autor.

Trabalhos aceitos, mas ainda não publicados, podem ser incluídos, fornecendo-se o nome do periódico seguido do ano e da informação: (no prelo). Deve-se evitar a citação de resumos apresentados em congressos.

Recomendamos a utilização de programas de editoração de referências bibliográfica (por exemplo, EndNote, Reference Manager) selecionando-se a opção de estilo Vancouver.

Alguns exemplos:

Artigo em Revistas (listar todos os autores, mas se o número exceder seis, acrescentar: et al.):

Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol*. 2003;17(3):318-32.

Thomas TZ, Wang H, Niclasen P, O'Bryan MK, Evans LW, Groome NP, et al. Expression and localization of activin subunits and follistatins in tissues from men with high grade prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3851-8.

Artigo eletrônico na Internet publicado antes da versão impressa:

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood*. 2002;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

Capítulo de Livro:

Conte FA, Grumbach MM. Abnormalities of sexual determination and differentiation. In: Greenspan FS, Gardner DG, editors. *Basic & clinical endocrinology*. 6th ed. New York:McGraw-Hill; 2001.p.509-46.

Livro:

Leder P, Clayton DA, Rubenstein E. *Introduction to molecular medicine*. New York: Scientific American; 1994.

Base de dados na Internet:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from:
http://www.nlm.nih.gov/archive//20061212/mesh/jablonski/syndrome_title.html
 MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from:
<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>

G. Tabelas

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, digitada em espaço duplo e numerada em arábico, conforme seu aparecimento no texto; deve conter um título breve na parte superior e as explicações, legenda e estatística indicadas adequadamente no rodapé.

H/I. Figuras e Legendas

As figuras deverão ser preparadas originalmente em arquivo TIFF (*Tagged Image File Format*) ou EPS (*Encapsulated PostScript*) ou GIF (*Graphics Interchange Format*). As letras, os números e os símbolos inseridos nas figuras devem ser claros e de tamanho suficiente para serem legíveis,

mesmo após redução substancial para publicação. Os títulos e legendas das figuras devem ser fornecidos em folha separada, e nunca na própria figura.

Por ocasião da submissão inicial, as figuras poderão estar inseridas no arquivo Word ou PowerPoint, no entanto, quando aceito o MS, deverão ser enviadas as figuras nos arquivos originais com resolução mínima de 300 dpi. A publicação padrão contempla somente duas cores (preto - vermelho) por isso devem ser evitadas figuras multicoloridas. A inclusão de figura colorida implicará no encargo financeiro (R\$ 900,00/cada figura) que será custeado pelo autor, oportunamente solicitada pelo editor.