



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

ANA CAROLINA GHEZZI

**MARCADORES DA SÍNDROME METABÓLICA E DA CAPACIDADE
AERÓBIA DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*, WISTAR) EM
DIFERENTES IDADES: EFEITOS DO EXERCÍCIO**

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

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

ANA CAROLINA GHEZZI

**MARCADORES DA SÍNDROME METABÓLICA E DA CAPACIDADE
AERÓBIA DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*, WISTAR) EM
DIFERENTES IDADES: EFEITOS DO EXERCÍCIO**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Alice Rostom de Mello

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

2013

Este trabalho é financiado pela
“FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO
PAULO”

FAPESP

(Processo nº: 2010/12896-0)

574.1 Ghezzi, Ana Carolina
G421m Marcadores da síndrome metabólica e da capacidade
aeróbia de ratos (*rattus norvegicus albinus*, wistar) em
diferentes idades: efeitos do exercício / Ana Carolina Ghezzi.
- Rio Claro : [s.n.], 2013
142 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Alice Rostom de Mello

1. Fisiologia. 2. Parâmetros bioquímicos. 3.
Envelhecimento. 4. Máxima fase estável de lactato. I. Título.

DEDICATÓRIA: À Deus e aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tantas coisas vivenciadas não só nesse período de mestrado, mas durante todas as fases da minha vida!

Agradeço aos meus pais por ter me proporcionado esses anos de estudo e acima de tudo por terem não só me sustentado financeiramente, mas também por terem nutrido esse meu sonho na pós graduação.

Mãe para mim você é um exemplo de mulher virtuosa, te amo muito e quero que você saiba que cada coisa que conquistei na minha vida, cada etapa vencida foi graças à você e também dedicada a você, você é essencial para mim. Obrigada por me apoiar e por me incentivar tanto, te amo muito.

Agradeço aos meus irmãos, Paula, Gislaine e Marcelo por terem crescido comigo e por terem sempre servido de referência e estímulo, vocês fazem parte de mim, pois são muitas histórias em comuns que nos compõe.

Minhas companheiras e amigas de República obrigada por conviverem comigo, tantas ajudas e risadas...como sentirei falta de vocês todas.

Gostaria de dizer que durante esses anos de mestrado obtive muito mais do que aprendizado técnico ou teórico, aprendi muito como pessoa, gostaria de agradecer a convivência com pessoas tão especiais como a Lucieli e o José Diego, vocês me fizeram rir muito, mesmo em meio ao estresse, Lú você é uma amiga muito especial, obrigada pelo seu auxílio em todos os momentos, obrigada pela amizade!

Meu muito obrigada também ao meu marido Jonathan, você fez parte de todo esse processo de aprendizado e sabe o quanto muitas vezes foi árduo, mas também gratificante.

Agradeço a minha orientadora Maria Alice pelo auxílio, pela confiança e acima de tudo por sempre estar acessível e por exercer o seu papel como orientadora de forma tão excepcional.

Agradeço também aos professores que compuseram minha banca de qualificação e que contribuíram de forma tão brilhante para esse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que compõe o laboratório (graduandos, mestrandos, doutorandos e técnicos), vocês todos foram indispensáveis para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

A Síndrome Metabólica, nas últimas décadas, tornou-se um problema de saúde pública ao redor do mundo. Estudos longitudinais em humanos apresentam limitações quanto ao caráter invasivo de certas análises, ao tamanho e à aleatoriedade da amostra. Com isto, modelos animais, capazes de mimetizar as respostas fisiológicas humanas podem auxiliar na investigação desta doença. Nesse contexto, o presente estudo foi delineado para analisar marcadores da Síndrome Metabólica em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, em diferentes idades. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo: Grupo I - foram avaliados aos dois meses (idade jovem), Grupo II – avaliado aos quatro meses (idade adulta jovem), Grupo III – avaliado aos seis meses (idade adulta), Grupo IV – avaliado aos doze meses de idade (maturidade), Grupo V – foram avaliados aos doze meses de idade, porém esses animais foram submetidos a treinamento de natação em tanques individuais na intensidade equivalente à 80% da Máxima fase estável de lactato, 1 hora por dia 5 vezes por semana, o treinamento foi iniciado aos 4 meses de idade e durou até os 12 meses, e o Grupo VI – avaliado aos doze meses de idade e foram submetidos ao mesmo tipo de treinamento do que o Grupo V, porém o treinamento durou dos 4 meses até os 8 meses para que fosse evidenciado os efeitos de destreinamento, após esse período foram mantidos sedentários até os 12 meses quando foram realizadas as análises. Todos os grupos foram analisados quanto à: tolerância à glicose (teste de tolerância à glicose); sensibilidade à insulina (teste de tolerância à insulina); máxima fase estável de lactato (MFEL); concentrações séricas de jejum de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-C e LDL-C, captação de glicose pelo músculo sóleo isolado e concentração de lipídios totais e peso do tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitonal, concentração de glicogênio hepático, no muscular e cardíaco. O envelhecimento originou sinais da síndrome metabólica nos ratos Wistar. Esses animais apresentaram, na maturidade, aumento significativo do peso corporal, associado ao incremento do tecido adiposo nas regiões avaliadas, bem como elevação na concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e LDL-C, caracterizando dislipidemia. Também apresentaram aumento da glicose sérica quando comparados aos grupos mais jovens. Assim sendo, ratos Wistar em processo de envelhecimento parecem um modelo interessante para o estudo das alterações desencadeadas pela síndrome metabólica. O envelhecimento ocasionou também declínio na capacidade aeróbia de animais sedentários, porém o exercício físico pode diminuir os efeitos deletérios da idade e ainda prevenir a obesidade, o que é de grande interesse, pois a capacidade aeróbia tem sido relacionada com uma vida saudável. Por fim, o treinamento físico em intensidades

submáximas (80% da MFEL) mantidos até os 12 meses em ratos idosos provocou importantes adaptações, como diminuição do peso corporal e da concentração de lipídios da região mesentérica, aumento da carga de exercício físico na intensidade de máxima fase estável de lactato, bem como maior tolerância a glicose, houve um incremento dos depósitos de glicogênio muscular e também da captação de glicose pelo músculo esquelético. Já os animais Destreinados já não demonstraram diferença de peso corporal e não possuíam maiores valores de glicogênio muscular que os animais Sedentários.

Palavras chave: Síndrome Metabólica, parâmetros bioquímicos, envelhecimento, máxima fase estável de lactato.

ABSTRACT

In recent decades, metabolic syndrome has become a public health problem throughout the world. Longitudinal studies in humans have several limitations due to the invasive nature of certain analyses and the size and randomness of the study populations. Thus, animal models that are able to mimic human physiological responses could aid in investigating metabolic disease. Thus, the present study was designed to analyze metabolic disease markers in albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of different ages. The following parameters were assessed at two (young), four (young adult), six (adult), and twelve (mature) months of age: glucose tolerance (glucose tolerance test); insulin sensitivity (insulin tolerance test); fasting serum glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol concentrations; glucose uptake in isolated soleus muscle; and total lipid concentration in subcutaneous, mesenteric, and retroperitoneal adipose tissue. We found that aging triggered signs of metabolic syndrome in Wistar rats. For example, mature rats showed a significant increase in body weight that was associated with an increase in the total lipid content in the adipose tissue of evaluated regions. In addition, mature rats showed an increase in the serum concentration of triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol, which was characteristic of dyslipidemia. There was also an increase in serum glucose compared to the younger groups of animals. Therefore, aging Wistar rats appear to be an interesting model to study the changes related to metabolic syndrome.

Thus, it can be concluded that with physical training at submaximal intensities (80% of MLSS) maintained for up to 12 months in mature rats led to important adaptations, such as a decrease in body weight and in total lipid concentration in the mesenteric region, an increase in workload during MLSS intensity tests, along with a higher glucose tolerance, there was an increase in muscular glycogen deposits and glucose uptake by skeletal muscle. However, the untrained animals were not found to have any differences in body weight and they did not possess higher values of muscular glycogen, nor a greater capacity of glycogen uptake than the sedentary animals. Physical exercise with submaximal characteristics are more appealing and easier to maintain for both healthy populations and populations with some type of metabolic alteration, such as metabolic syndrome; however, for physical exercise to offer all of these benefits, it must be consistent and for the long-term.

Keywords: Metabolic syndrome, biochemical parameters, metabolism, aging, Wistar rats

Sumário

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
Lista de Abreviaturas.....	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Síndrome Metabólica.....	5
2.2 Obesidade	7
2.3 Diabetes Mellitus.....	8
2.4 Dislipidemia	10
2.5 Hipertensão	11
2.6 Atividade física e doenças metabólicas	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Aspectos Éticos	14
3.3 Delineamento e Grupos Experimentais	14
3.4 Treinamento Físico	15
3.5 Avaliações prévias ao sacrifício	15
3.5.1 Avaliações gerais:.....	15
3.5.2 Teste de tolerância à glicose – GTT	16
3.5.3 Teste de Tolerância à insulina - ITT.....	16
3.5.4 Máxima Fase Estável de Lactato - MFEL	16
3.6 Eutanásia dos animais e obtenção de material biológico	17
3.6.1 Sangue	17
3.6.2 Tecido adiposo.....	17
3.6.4 Músculo sóleo.....	18
3.7 Análise estatística	18
Figura 1: Desenho experimental.....	19
4 RESULTADOS	20
4.1 CAPÍTULO 1:	21
Resumo	21
Introdução.....	22
Material e métodos	24
Resultados.....	27
Discussão	32

Conclusão:	34
Referências	35
4.2 CAPÍTULO 2:	39
Resumo	39
Introdução	40
Material e métodos	42
Resultados	44
Discussão	47
Referências	49
4.3 CAPÍTULO 3:	53
Resumo	53
Introdução	54
Materias e Métodos	56
Discussão	62
Referências	65
5. CONCLUSÕES GERAIS:	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	71
7. ANEXOS	86
7.1 ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO NA DIABETOLOGY & METABOLIC SYNDROME	87
7.2 ANEXO 2: ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS	95
7.3 ANEXO 3: ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS	114
7.4 ANEXO 4: ARTIGO PUBLICADO NA LIPIDS IN HEALTH AND DISEASE.	132
7.5. ANEXO 5: COMITÊ DE ÉTICA	141

Lista de abreviaturas

GTT: teste de tolerância à glicose;

HDL-C: lipoproteína de alta intensidade;

IMC: índice de massa corporal;

ITT: teste de tolerância à insulina;

K-ITT: constante de remoção da glicose sérica;

LDL-C: lipoproteína de baixa intensidade;

MFEL: máxima fase estável de lactato;

SM: Síndrome metabólica

VLDL: lipoproteína de muito baixa intensidade

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1: Desenho Experimental.....	19
--	----

Resultados

Capítulo 1:

Figura 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo, do peso corporal (A), do comprimento naso-anal (B) e da ingestão alimentar (C).....	27
--	----

Figura 2: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de glicemia e área sob a curva dos valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose –GTT.....	28
--	----

Figura 3: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de glicemia e constante de remoção de glicose-KITT durante o teste de tolerância à insulina -ITT.....	29
---	----

Figura 4: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de captação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) pelo músculo sóleo isolado.....	31
--	----

Capítulo 2:

Figura 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo da carga na qual foi encontrada à Máxima Fase Estável de Lactato.....	45
---	----

Figura 2: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo da concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) durante exercício na carga equivalente à máxima fase estável de lactato.....	46
--	----

Lista de tabelas

Introdução

Tabela 1: Valores de referência para diagnóstico da Síndrome Metabólica segundo as definições abordadas.....	6
---	---

Resultados

Capítulo 1:

Tabela 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores das concentrações séricas de glicose (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL (mg/dL) e LDL (mg/dL).....	30
--	----

Tabela 2: Média e desvio padrão da concentração de lipídios totais (mg/100g) no tecido adiposo de diferentes regiões de 8 animais por grupo.....	30
---	----

Capítulo 2:

Tabela 1: Valores da média e desvio padrão do peso corporal e somatório das gorduras totais das regiões mesentérica, retroperitonal e subcutânea.....	44
--	----

Capítulo 3:

Tabela 1: Média e desvio padrão dos valores de glicemia e da área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose – GTT.....	60
---	----

Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de glicemia e constante de remoção de glicose - KITT durante o teste de tolerância à insulina – ITT.....	60
---	----

Tabela 3: Média e desvio padrão do peso corporal (g) e da concentração de lipídios totais do tecido adiposo (mg/100g) mesentérico, retroperitoneal, subcutâneo dos animais ao final do experimento.....	61
--	----

Tabela 4: Média e desvio padrão da glicose sérica (mg/dl), glicogênio (mg/100mg) cardíaco, hepático e muscular, e captação de glicose pelo músculo sóleo isolado ($\mu\text{mol/g.h}$).....	61
--	----

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Metabólica (SM) caracteriza-se por um agrupamento de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes mellitus, geralmente ligados à resistência à insulina e à obesidade central (DUNCAN & SCHIMIDT, 2001). A doença cardiovascular é a maior causa de morbidade e de mortalidade mundial (WHO, 1999). Por isso é de grande importância o estudo da SM como preditora de problemas cardiovasculares.

Com a idade, há um aumento da prevalência de doenças cardiovasculares, o que é de grande preocupação, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida da população (ISOMAA et al., 2001; KAHN et al., 2005). O envelhecimento da população mundial tem causado preocupações quanto ao equilíbrio da pirâmide etária. Estima-se que, a proporção de pessoas acima de 65 anos aumente de 5,2% em 1950 para 15,6% em 2050, fazendo com que, os idosos representem quase um quinto da população mundial (IBGE, 2002).

A prevalência da Síndrome Metabólica na população dos Estados Unidos é de 20 a 25%, e de cerca de 55% na população idosa (FORD et al., 2002). No Brasil foi observada uma prevalência de SM em 52,3% dos idosos, porém, devido a diferentes definições para a Síndrome, a prevalência pode diferir entre os estudos (PEDRO, 2008).

A definição mais utilizada para a Síndrome Metabólica é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), na qual é imprescindível a presença da diabetes mellitus ou resistência à insulina e mais duas das seguintes características: elevada razão cintura/quadril, concentrações elevadas de triglicerídeos ou baixa concentração de HDL-C, pressão arterial e excreção urinária de albumina elevadas (WHO, 1999). A National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP, 2002) propôs uma série de critérios mais simples de serem avaliados, os quais incluem: glicemia de jejum, pressão arterial, circunferência da cintura, triglicerídeos e HDL-C.

Por outro lado, a International Diabetes Federation (IDF, 2004) define a SM como a obesidade central, sendo o fator primordial. Em estudos que utilizaram essa definição como parâmetro, a prevalência de Síndrome Metabólica foi maior, principalmente entre idosos, pois essa população tem um ganho de peso corporal significativo com o passar da idade, devido à diminuição do metabolismo basal (ADAMS et al., 2005), entre outras causas.

O crescimento do número de idosos é um dos principais fatores para o aumento da prevalência da SM na população mundial (DOMINGUEZ et al., 2007), já que o

envelhecimento aumenta os fatores de risco para as doenças que caracterizam a Síndrome Metabólica.

Em função das limitações que envolvem os estudos com seres humanos, grande parte da compreensão sobre a etiologia das características da SM é proveniente de estudos utilizando modelos animais. No entanto, a maioria dos estudos experimentais tem sido realizada em modelos que desenvolvem geneticamente obesidade, hipertensão ou dislipidemia isoladas (AITMAN et al., 1999; KLIMES et al., 1995; MATHE et al., 1995).

Pesquisas utilizando modelos que desenvolvem um quadro completo de Síndrome Metabólica, incluindo todos os distúrbios acima mencionados, são mais raras. Foi demonstrado que a linhagem de ratos Wistar Ottawa Karlsburg (WOKW) desenvolve geneticamente quadro quase completo da Síndrome Metabólica com obesidade, moderada hipertensão, dislipidemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia (VAN DEN BRANDT et al., 2000a). Além disso, um estudo transversal comparativo indicou que o rato WOKW começa a manifestar os sinais da Síndrome Metabólica entre 8 e 10 semanas de idade (VAN DEN BRANDT et al., 2000b).

Outra situação que conduz à manifestação de sinais da Síndrome Metabólica, também em roedores, é o envelhecimento e sabe-se que, tal manifestação difere entre as linhagens de ratos. Por exemplo, o rato Fisher 344, que tem sido bastante usado em estudos que avaliam separadamente aspectos da Síndrome Metabólica (FINK et al., 1986; KERN et al., 1992; BARNARD et al., 1992, CARTEE et al., 1993; MATTHAEI et al., 1990), mostra pequeno aumento do peso corporal aos 24 meses de idade. Nessa linhagem, os adipócitos aumentam marcadamente de tamanho e as concentrações plasmáticas de insulina são ligeiramente elevadas em ratos idosos. Já os ratos da linhagem Sprague-Dawley têm aumento agudo do peso corporal e da insulinemia (NARIMIYA et al., 1984; BARZILAI; ROSSETTI, 1995). Ratos Wistar com 24 meses de idade apresentam insulinemia semelhante àquela de ratos adultos com três meses (CARRASCOSA et al., 1989), apesar do grande aumento do peso corporal e da hiperplasia dos adipócitos (NEWBY et al., 1990) bem como, do decréscimo da captação periférica de glicose (ESCRIVA et al., 1997) com o envelhecimento. Ainda, estudos recentes destacam que as condições consideradas “padrão” para a manutenção de roedores de laboratório em geral, ex, gaiolas coletivas, contendo 2 a 5 animais por gaiola, em reduzido espaço coberto com serragem e com livre acesso ao alimento, podem favorecer o desenvolvimento da Síndrome Metabólica em ratos e camundongos. Isso poderia torná-los modelos adequados da obesidade humana (MARTIN et al., 2010).

Por outro lado a literatura é consistente ao afirmar que exercícios físicos ocasionam uma série de benefícios para o organismo como, controle de peso corporal (CARPENTER et al., 2012; MILLER et al., 2012), com diminuição da massa gorda e aumento da massa magra, o que pode atuar diminuindo o LDL colesterol e o colesterol total, assim como aumentando o HDL colesterol (GUEDES et al., 2007; KELLEY et al., 2005), o exercício físico reduz glicemia, melhorando a responsividade da musculatura à ação da insulina (KARTZEL et al, 1995). Auxilia igualmente na melhora da capacidade aeróbia e no controle da pressão arterial (WAREMAN et al., 2000; DE SOUZA et al., 2000), estendendo os benefícios aos fatores psicológicos e sociais (CAMACHO et al., 1991) .

Níveis adequados de aptidão cardiorrespiratória estão diretamente relacionados com a promoção de efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares, e inversamente relacionados com variáveis de risco cardiovascular e metabólico (TWISK et al., 2002).

A atividade física tem um papel fundamental na prevenção e tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas e contribui para o aumento da expectativa de vida, melhorando a capacidade funcional do indivíduo e refletindo em uma melhora nas atividades de vida diária.

Contudo, são escassos os estudos que acompanham simultaneamente a capacidade aeróbia e o desenvolvimento de marcadores variados da Síndrome Metabólica, decorrentes do envelhecimento em ratos da linhagem Wistar, muito usados em experimentos no Brasil e que têm sido empregados nos mais diferentes estudos do Laboratório de Nutrição, Metabolismo e Exercício, do Departamento de Educação Física, IB, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, SP (MOURA et al., 2008; MOTA et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2007; GOMES et al., 2005; CAMBRI et al., 2010; GHEZZI et al., 2011). Assim sendo, o presente estudo foi delineado para analisar marcadores da síndrome metabólica e a capacidade aeróbia em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, em diferentes idades, assim como avaliar os efeitos do treinamento físico sobre esses marcadores.

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo foi delineado para analisar marcadores da síndrome metabólica e da capacidade aeróbia em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação *albinus*, em diferentes idades, assim como, avaliar os efeitos do treinamento físico sobre esses marcadores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar, em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, variação *albinus*, aos dois (idade jovem), quatro (idade adulta jovem), seis (idade adulta) e doze meses de vida (maturidade):

1. Peso corporal, comprimento corporal e ingestão alimentar.
2. Tolerância à glicose, pelo teste oral de tolerância à glicose (GTT) e sensibilidade à insulina, pelo teste de tolerância à insulina (ITT);
3. Capacidade aeróbia pela determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL);
- 4.
5. Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-C, LDL-C;
6. Peso e concentração de lipídios totais do tecido adiposo das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior;
7. Captação de glicose, estimulada por insulina, pelo músculo estriado esquelético (sóleo) isolado;
8. Concentração de glicogênio no músculo sóleo, fígado e do coração;
9. Efeitos do treinamento e destreinamento de natação, na intensidade de 80 % da máxima fase estável de lactato, iniciado na idade adulta jovem (quatro meses) sobre as variáveis enumeradas anteriormente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome Metabólica

O conjunto de distúrbios hoje chamado de Síndrome Metabólica já recebeu nomes como; Síndrome X, Síndrome de Resistência à Insulina, Quarteto Mortal, Cintura Hipertrigliceridêmica e Síndrome Plurimetabólica.

Desde a descrição inicial feita por Reaven em 1988 (REAVEN, 1988), diversos órgãos tem estipulado critérios para definir a Síndrome Metabólica, dentre esses, os mais aceitos e conhecidos são National Cholesterol Education Program (NCEP) / American Heart Association (AHA), International Diabetes Federation (IDF) e Organização Mundial da Saúde (OMS). Essas definições estão expostas na tabela 1.

A Síndrome Metabólica pode ser entendida como um transtorno complexo que culmina em fatores de risco cardiovascular, geralmente ligados à obesidade visceral e à resistência à insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

A prevalência estimada de SM utilizando a definição da National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) para homens com peso normal é de 4,6%, já para mulheres do mesmo grupo a prevalência é de 6,2%. Para homens classificados segundo o IMC com sobrepeso a prevalência foi de 22,4% e para mulheres 28,1%. Já para obesos a prevalência para homens foi de 59,6% e para mulheres 50% (FORD et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que a prevalência para a SM quase dobra para indivíduos do sexo masculino acima de 55 anos. A prevalência para idade inferior de 55 anos é de 23% para homens e de 13% para as mulheres, porém quando analisada a população com idade superior a 55 anos a prevalência vai para 41% e 26% para homens e mulheres respectivamente (EGIR, 2002).

O estudo da SM é de grande importância, pois a SM é preditora para doenças cardiovasculares. Estudos em humanos apresentam limitações pelo caráter invasivo de certas análises e, devido à isso, diversos estudos tem sido feitos com modelos experimentais. Nesses estudos, diferentes protocolos têm sido empregados no sentido de tornar possível o estudo da

Síndrome Metabólica. Ghezzi et al. (2011) utilizaram dieta rica em frutose (60%) para que fosse possível observar o desenvolvimento do quadro da SM, outros tem trabalhado com modificações nos genes para obesidade, hipertensão ou dislipidemia isoladas (KLIMES et al., 1995; MATHE et al., 1995; AITMAN et al., 1999), porém o quadro completo da SM ainda não foi completamente instaurado para que pudéssemos observar o efeito dos fármacos e de outras medidas alternativas na SM, como a atividade física.

Existem estudos que afirmam que a atividade física promove alterações benéficas na saúde dos indivíduos. Contrariamente ao tratamento farmacológico, a atividade física pode ser capaz de atuar de forma positiva em todos os componentes da Síndrome Metabólica (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004).

Tabela 1: Valores de referência para diagnóstico da Síndrome Metabólica segundo as definições abordadas.

Definição	OMS (1999)¹	NCEPATP III 2002²	IDF 2005³	AHA/NHLBI 2005⁴
Parâmetro Clínico	DM, IG ou RI e mais ≥ 2 dos seguintes	Associação de ≥ 3 dos seguintes	Obesidade central e + ≥ 2 dos seguintes	Associação de ≥ 3 dos seguintes
Obesidade	Homens $>0,90$	H: PC ≥ 102	M: PC ≥ 94	H: PC ≥ 102
RCQ	Mulheres $>0,85$	M: PC ≥ 88	H: PC ≥ 80	M: PC ≥ 88
Dislipidemia (mg/dl)	TG >150 H: C-HDL <35 M: C-HDL <39	TG ≥ 150 H: C-HDL <40 M: C-HDL ≥ 50	TG ≥ 150 H: C-HDL <40 M: C-HDL <50	TG ≥ 150 H: C-HDL <40 M: C-HDL <50
Hipertensão arterial (mmHg)	$>140/90$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$
Glicose (mg/dl)	>110	≥ 110	≥ 110	≥ 110
Microalbuminúria ($\mu\text{g}/\text{min}$)	>20			

H, homens; M, mulheres; PC, perímetro da cintura; TG, triglicéridos; C-HDL, colesterol HDL; IMC: índice de massa corporal; RCQ: razão cintura quadril, IG: Intolerância à glicose, RI: resistência à insulina restantes abreviaturas conforme o texto.

¹Organização Mundial da Saúde

²National Cholesterol Evaluation Program for Adult Treatment Panel III

³Federação Internacional de Diabetes

⁴American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement.

2.2 Obesidade

A obesidade e sobrepeso são classificados como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode comprometer a saúde, tem causa multifatorial (KLAUS et. al., 2004) e na maioria dos casos é causada por uma ingestão de nutrientes superior ao gasto calórico total.

Estimativas demonstram que em 2025 o Brasil será o 5º país no ranking mundial na incidência de obesidade (DÂMASO, 2001). Porém não é somente no Brasil que esses números vêm crescendo, em pouco tempo houve um aumento exponencial da obesidade no mundo, o que a tornou um problema de saúde pública (OMS, 1995).

A obesidade em todo o mundo mais que dobrou desde 1980. Em 2008, 1,5 bilhão de adultos acima de 20 anos estavam acima do peso, destes adultos 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres se tornaram obesos (WHO, 2000).

Uma importante medida que tem sido utilizada para auxiliar na identificação de risco para a SM é o perímetro da cintura e razão cintura quadril, pois a obesidade visceral tem sido apontada como mais prejudicial do que a gordura subcutânea (NUGENT, 2004). O tecido adiposo visceral é mais sensível a lipólise e mais resistente à ação da insulina liberando com isso, uma maior concentração de ácidos graxos livres na corrente sanguínea (KELLEY, 2000).

Em estudos epidemiológicos, o índice mais utilizado para classificar a obesidade é o índice de massa corporal (IMC), calculado pela fórmula peso (em kg) dividido pelo quadrado da altura (em metros), os valores obtidos fora da faixa de eutrofia estão relacionados com uma maior taxa de problemas metabólicos (ROZOWSKI et al., 1997; BELIZZI et al., 1999; WILLETT et al., 1999; STEVENS et al., 2001).

O uso de dados antropométricos como estatura corporal, peso, sexo e idade para a identificação da obesidade, são utilizados em diversos estudos, pois é de fácil quantificação e

de baixíssimo custo. A OMS (1995) coloca que indivíduos com um IMC maior ou igual a 25 são classificados com sobrepeso e com IMC maior ou igual a 30 classificados como obesos.

Sobrepeso e obesidade é o 5º fator na lista de doenças que mais matam no mundo. Pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado do excesso de peso e obesidade; além disso são atribuídas a obesidade 44% dos casos de diabetes, 23% dos casos de cardiopatias isquêmicas e entre 7% a 41% dos carcinomas.

A obesidade está fortemente ligada a SM. Pessoas obesas apresentaram 59,6% mais chances de desenvolver SM, enquanto pessoas com sobrepeso tinham 22,4 % e pessoas com peso normal 4,6% (YONG-WOO PARK et al., 2003).

O aumento de 20% no peso corporal eleva o risco de desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, diabetes, doenças cardiovasculares e conseqüentemente da SM (COUTINHO, 1999).

A obesidade pode ser causada por fatores exógenos (ex. alimentação, inatividade física) e endógenos (ex. problemas endócrinos), os fatores exógenos representam 95% dos casos enquanto fatores endógenos representam somente 5% dos casos de obesidade (DÂMASO, 2005).

Diante da grande incidência de obesidade por causa exógena a abordagem mais efetiva será se o estilo de vida do indivíduo for alterado. Essa abordagem deve ser feita por profissionais de maneira integrada, e é de grande importância que atividade física seja incorporada a rotina do indivíduo, pois atividade física conjugada a uma dieta balanceada pode levar o indivíduo a um balanço energético negativo, conduzindo assim a perda de massa gorda (BENSIMHON et al., 2006).

2.3 Diabetes Mellitus

O termo diabetes mellitus descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia. A hiperglicemia crônica resulta de defeitos na secreção de insulina (falência da célula beta) ou ainda na ação deficiente desse hormônio nos tecidos-alvo ocasionando a distúrbios do metabolismo de gordura, carboidratos e proteínas (SNOWLING; HOPKINS, 2006).

Vários mecanismos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento de diabetes. Estes incluem processos que destroem as células beta do pâncreas, com conseqüente

deficiência de insulina (KELLY, 2003), e outros que resultam em resistência periférica à ação da insulina.

Muitas vezes os sintomas da diabetes não são graves, ou podem estar ausentes e, conseqüentemente a hiperglicemia pode causar alterações patológicas e funcionais antes que o diagnóstico seja feito. Os efeitos, a longo prazo, da diabetes mellitus incluem o desenvolvimento progressivo de complicações específicas de retinopatia com potencial de cegueira, neuropatia e nefropatia, que pode levar à insuficiência renal. Pessoas com diabetes têm um risco aumentado de doença cardiovascular, vascular periférica e doença cerebrovascular (BOULE et al., 2001).

Indivíduos com diabetes mellitus podem apresentar sintomas característicos, tais como sede, poliúria e perda de peso. Em sua forma mais grave a diabetes leva o indivíduo a cetoacidose que pode levar ao coma e na ausência de tratamento eficaz, a morte.

Os principais tipos de diabetes são diabetes tipo 1 e o diabetes tipo 2.

Diabetes tipo 1 é caracterizada pela produção deficiente de insulina e requer a administração diária desse hormônio. O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune, há destruição das células beta do pâncreas que tem como função produzir insulina. A insulina é responsável por uma série de reações no interior da célula que vai culminar na translocação do GLUT 4 para a periferia da célula, o GLUT é o responsável pela captação de glicose para o meio intracelular (MIKLOSZ et al., 2011).

Os sintomas de diabetes tipo 1 incluem excreção excessiva de urina (poliúria), sede (polidipsia), fome constante (polifagia), perda de peso, alterações na visão e fadiga.

Já a Diabetes tipo 2 resulta da resistência à insulina, mas também de disfunção das células beta, uma vez que a doença só se instala quando essas células falham em compensar a maior necessidade de insulina. Diabetes tipo 2 é composto por 90% das pessoas com diabetes em todo o mundo e é em grande parte resultado de excesso de peso e inatividade física. Os sintomas podem ser semelhantes aos do diabetes tipo 1, mas muitas vezes menos acentuados. Como resultado, a doença pode ser diagnosticada vários anos após o início, uma vez que, as complicações já surgiram.

Diabetes aflige quase 1 em cada 10 adultos com idade superior a 45 anos e é a sétima causa de morte (HARRIS et al., 1998; STEWART et al., 1989). Os custos totais anuais atribuíveis ao diabetes são estimados em cerca de 100 bilhões de dólares e é responsável por 15% de todos os cuidados de saúde nos EUA (EDMA, 2007).

O risco de desenvolver diabetes tipo 2 aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física (ZIMMET et al., 1992; HARRIS et al., 1995). Ocorre mais frequentemente

em mulheres com diagnóstico prévio de Diabetes Mellitus Gestacional e em indivíduos com hipertensão ou dislipidemia. Sua frequência varia em diferentes subgrupos raciais / étnicos (ZIMMET et al., 1992; VALLE et al., 1997; COURTEN et al., 1997). Ela é frequentemente associada com fatores ambientais e provável predisposição genética (KNOWLER et al., 1993). No entanto, a genética desta forma de diabetes são complexas e não claramente definidas.

2.4 Dislipidemia

Dislipidemias, também chamadas de hiperlipidemias, referem-se a presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue, principalmente do colesterol e dos triglicerídeos. A interação entre fatores genéticos e ambientais determinam o fenótipo do perfil lipídico. (DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007)

Estudos prospectivos sugerem que anormalidades lipídicas estão associadas com risco aumentado de eventos cardiovasculares em pacientes com e sem diabetes. Vários estudos têm demonstrado que LDL, HDL e triglicerídeos são preditores independentes de doenças cardiovasculares.

Hiperlipidemia representa um importante fator de risco para o desenvolvimento precoce de aterosclerose e complicações cardiovasculares (CHANDLER et al., 2003; HARNAFI et al., 2007).

A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas. O acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos, que se depositam na parede das artérias, são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (GOTTLIEB et al., 2005; SPOSITO et al., 2007).

De acordo com SPOSITO et al. (2007), um estudo conduzido em nove capitais brasileiras, envolvendo 8.045 indivíduos com idade mediana de 35 ± 10 anos, no ano de 1998 demonstrou que 38% dos homens e 42% das mulheres possuem níveis séricos de colesterol total acima dos valores da normalidade.

Um estilo de vida mais ativo tem sido associado com valores de lipídeos plasmáticos mais satisfatórios. Indivíduos ativos tem menor risco de desenvolver aterosclerose do que sujeitos sedentários (GUEDES et al., 2007), o que pode ser explicado pelo aumento da atividade da lipoproteína lipase durante a realização do exercício moderado-a-vigoroso e também após o esforço físico (DURSTINE et al., 2001; WILLIAMS et al., 2001).

No tratamento da hipercolesterolemia, o exercício físico mostra efeito bastante positiva para normalizar o perfil lipídico e consequentemente reduzir as doenças coronarianas, além de beneficiar o condicionamento físico (FLETCHER et al., 1992; WILMORE, 2001). Portanto a associação de atividade física e uma dieta balanceada pode ser a abordagem ideal para diminuir incidência de doenças cardiovasculares e ainda elevar a qualidade de vida da população, com conseqüente diminuição dos gastos ligados à saúde.

2.5 Hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença com etiologia multifatorial, dentre as causas estão a hereditariedade, obesidade, sedentarismo, alcoolismo, estresse, tabagismo e outras e ocorre quando a medida da pressão se mantém freqüentemente acima de 140 por 90 mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 1999)

Hipertensão arterial pode provocar alterações no sistema circulatório, vasos sanguíneos e musculatura cardíaca, e consequentemente a um acidente vascular cerebral (AVE), infarto do miocárdio e morte. 40% do total das mortes por acidentes vasculares cerebrais e 25% das doenças coronarianas são associadas à hipertensão arterial (PAGE et al., 1999; ROCHA et al., 1999)

Por volta de 90% dos casos de hipertensão são considerados idiopáticos, ou hipertensão primária. A prevalência da hipertensão em 2004 era de 35% da população brasileira acima de 40 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Acredita-se que 20% da população mundial apresente hipertensão (BARROS et al., 2009).

A hipertensão arterial é considerada uma doença silenciosa, pois na maioria dos casos não são observados quaisquer sintomas no paciente, porém quando estes ocorrem, são vagos e comuns a outras doenças, tais como dor de cabeça, tonturas, cansaço, enjoos, falta de ar e sangramentos nasais (BRANCHE et al., 1991).

Existem várias evidências dos efeitos benéficos da prática de atividade física sobre a pressão arterial em indivíduos de todas as idades. Alto nível de atividade física diária está associado a menores valores de pressão arterial em repouso (WAREMAN et al., 2000). A prática regular de exercício físico parece prevenir o aumento da pressão arterial associado à idade (GORDON et al., 1990; KASCH et al., 1990), mesmo em indivíduos com risco aumentado de desenvolvê-la (PAFFENBARGER et al., 1991).

2.6 Atividade física e doenças metabólicas

A atividade física tem um papel fundamental na prevenção e tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas e contribui para o aumento da expectativa de vida, melhorando a capacidade funcional do indivíduo e refletindo em uma melhora nas atividades de vida diária.

A atividade física tem sido prescrita para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, seus fatores de risco, e outras doenças crônicas. Matsudo (2000), em uma revisão, aponta que a atividade física traz benefícios como perda de peso e manutenção da massa magra, diminuição da pressão arterial, melhora do perfil lipídico e da sensibilidade à insulina, dentre outros.

Segundo estudos da região sul do país, o sedentarismo está como primeiro fator de risco para doença arterial coronariana, com 71 %, seguido por antecedentes familiares, obesidade, tabagismo, hipertensão arterial e alterações na glicemia e no colesterol (GUS et al., 2002).

Níveis adequados de aptidão cardiorrespiratória estão diretamente relacionados com a promoção de efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares, e inversamente relacionados com variáveis de risco cardiovascular e metabólico (TWISK et al., 2002).

O estudo de Duarte et al. (2005) afirma que indivíduos que são classificados com SM quando comparados com os não portadores da Síndrome, são mais obesos e são menos ativos fisicamente. A atividade física tem um importante papel na promoção da saúde, pois pode atuar melhorando o quadro em diversos componentes da SM e de uma maneira mais direta na perda de massa gorda que está envolvida na gênese de várias alterações sistêmicas.

Existem evidências de que o principal mecanismo pelo qual o exercício aumenta o transporte de glicose para o músculo é pela translocação do GLUT-4 de compartimentos intracelulares para a membrana. Observa-se, portanto, que indivíduos diabéticos com ausência de insulina ou deficiência na ação deste hormônio conseguem utilizar glicose para contração muscular durante o exercício físico, podendo esta utilização contribuir para a redução da hiperglicemia (PAULI, et al., 2010).

Estudos epidemiológicos, demonstram associação entre os altos níveis de sedentarismo ou baixos índices de condicionamento físico com a presença de hipertensão arterial. Atividades aeróbias tem sido indicadas para hipertensos, pois trazem adaptações extremamente importantes, essas adaptações estão ligadas com alterações autonômicas e hemodinâmicas que

vão influenciar o sistema cardiovascular, diminuindo então a pressão arterial tanto em repouso quanto em exercício físico.

Estudos vem demonstrando que o treinamento físico tem efeito favorável também na dislipidemia. Indivíduos treinados apresentam maiores níveis de HDL colesterol e menores níveis de triglicérides, LDL e VLDL colesterol, comparados a indivíduos sedentários. Segundo Guedes (2007), os resultados sugerem significativo impacto da atividade física no perfil lipídico em adultos de ambos os sexos, independentemente da idade e das variações do peso corporal.

A prática regular de exercícios físicos, tanto a curto como a longo prazo, principalmente de características aeróbias, promove benefícios pela redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (BLAIR et al., 1999), que representam, na atualidade, uma das principais causa de morte em países desenvolvidos ao redor do mundo, tanto em homens como em mulheres (VARADAY et al., 2004).

O exercício físico trará maiores benefícios para a saúde do indivíduo se for prescrito de forma individualizada, respeitando os objetivos e a capacidade física, independente de qual agravo metabólico esse indivíduo possuir (CIOLAC et al., 2004).

Os efeitos benéficos da atividade física não está somente restrito a melhoras cardiovasculares e ou em doenças metabólicas, existe também os benefícios psicossociais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação *albinus*, com idade entre dois e doze meses. Os animais, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu, foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física – IB – UNESP – Rio Claro. Os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina) e água *ad libitum*, e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (4 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro.

3.2 Aspectos Éticos

O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a legislação vigente no Brasil quanto à utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, (lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Todos os protocolos aos quais os animais foram sujeitos foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)-IB, UNESP, Rio Claro, sob o protocolo (UNESP IB Rio Claro 30/03/2010 – 000002638).

3.3 Delineamento e Grupos Experimentais

Os animais foram avaliados quanto a marcadores da Síndrome Metabólica e da capacidade aeróbia em diferentes idades:

Grupo I (n=8) – aos 2 meses (idade jovem);

Grupo II (n=8) – aos 4 meses (idade adulta jovem);

Grupo III (n=8) – aos 6 meses (idade adulta);

Grupo IV (n=8) – aos 12 meses (maturidade);

Grupo V (n=8) – submetidos ao treinamento físico iniciado na idade adulta jovem (4 meses), mantidos até o final do estudo (12 meses de idade) e avaliados aos doze meses;

Grupo VI (n=8) – submetidos ao treinamento físico iniciado na idade adulta jovem (4 meses), com duração de 4 meses (interrompido aos 8 meses de idade) e avaliados aos 12 meses.

Para melhor visualização na página 19 está disponível o desenho experimental do estudo.

3.4 Treinamento Físico

Os animais dos grupos treinados (V e VI) foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 1 hora por dia, 5 dias por semana, suportando sobrecarga de chumbo atada ao tórax, equivalente à 80% da sobrecarga na qual ocorre a transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual identificada pela máxima fase estável de lactato. De dois em dois meses, esses animais, foram reavaliados quanto à máxima fase estável de lactato para reajuste das cargas de treinamento.

3.5 Avaliações prévias ao sacrifício

3.5.1 Avaliações gerais

Todos os animais tiveram peso corporal, comprimento focinho-ânus e ingestão alimentar registrados uma vez por semana.

Uma semana antes de atingirem a idade pré estabelecida, os animais dos grupos I ao VI foram submetidos aos testes de tolerância a glicose, tolerância à insulina e máxima fase estável de lactato, com intervalo de 48 horas entre eles.

3.5.2 Teste de tolerância à glicose – GTT

A tolerância à glicose dos animais foi avaliada pelo GTT. Este foi realizado com os animais após 12 horas de jejum, quando uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 20% (2 g/Kg de peso) foi administrada aos ratos por uma sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos, com capilares heparinizados e calibrados para 25µL, visando a determinação das concentrações glicose.

Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método glicose-oxidase. Os resultados foram analisados através da determinação das áreas sob as curvas de glicose durante o teste pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990).

3.5.3 Teste de Tolerância à insulina - ITT

A sensibilidade periférica à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT). Este foi realizado com os animais 48 horas após o GTT, quando uma primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de insulina cristalina (“LILLY U 40) na dose de 30 UI/100g de peso foi administrada via subcutânea. Amostras de sangue, foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando a determinação das concentrações de glicose, pelo método da glicose-oxidase, utilizando kits comerciais. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $0,0693/t/2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue nos momentos após a administração de insulina em que a glicose sérica decaiu (LUNDBAEK et al., 1962) empregando-se o software ORIGIN.

3.5.4 Máxima Fase Estável de Lactato - MFEL

A identificação da transição aeróbia anaeróbia durante exercício de natação e a avaliação da capacidade aeróbia dos animais foram efetuadas pelo protocolo de máxima fase estável de lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios com cargas constantes (HECK et al., 1985) e sua determinação tem se mostrado útil na

prescrição de exercícios e na avaliação da capacidade aeróbia. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um protocolo para a determinação da MFEL para ratos durante exercício de natação (GOBATTO et al., 2001), que foi usado no presente estudo.

Resumidamente, os animais foram submetidos a vários testes de natação suportando sobrecargas constantes e crescentes entre um teste e outro em relação ao peso corporal, com intervalos de 48 horas entre eles, até que não foi mais possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício físico. Cada teste consistiu de 25 minutos de natação contínua suportando uma carga, com coleta de sangue, por pequeno corte na extremidade da cauda a cada 5 minutos para a determinação das concentrações de lactato. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em analisador de lactato. O critério de estabilização empregado foi diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 25 minutos de exercício.

3.6 Eutanásia dos animais e obtenção de material biológico

Ao atingirem a idade pré-estabelecida, todos os animais dos grupos I, II, III, IV, V e VI foram mortos, após anestesia profunda com CO₂, 48 horas depois da última avaliação "in vivo".

3.6.1 Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para a separação do soro e dosagem de glicose, triglicerídios, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, por métodos colorimétricos.

3.6.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior foram removidos para pesagem e determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As concentrações de lipídios nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira (1990)

3.6.3 Fígado, coração e sóleo

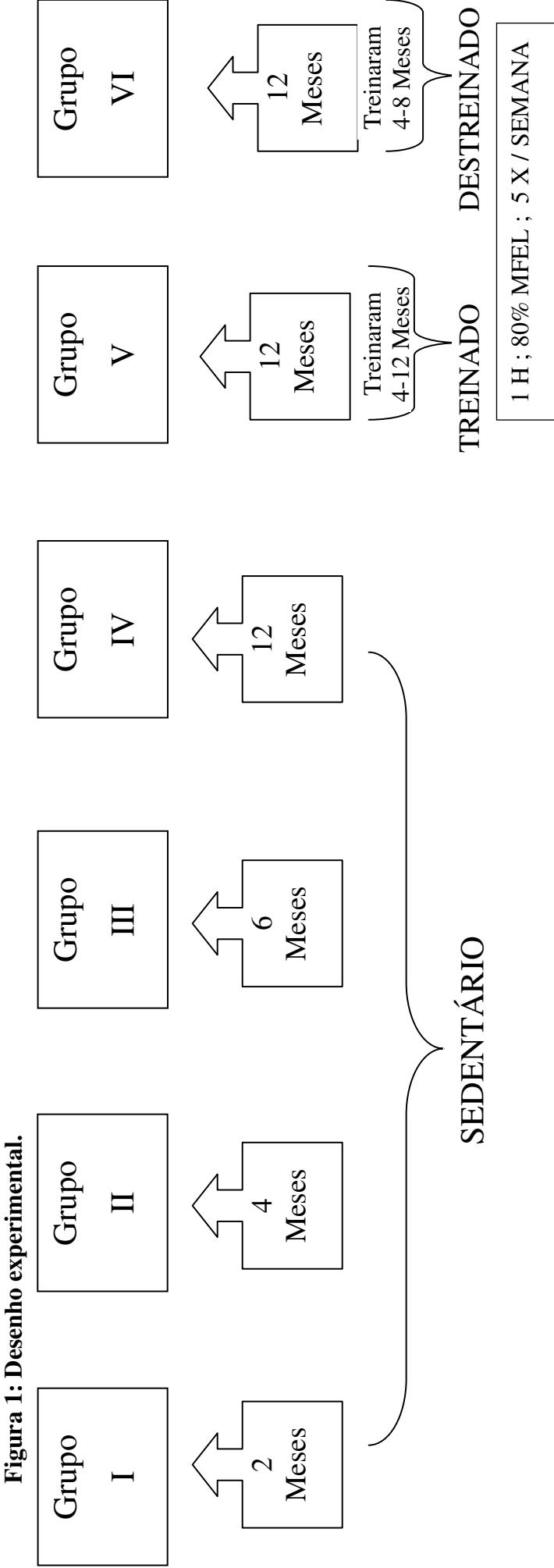
Alíquotas do fígado, coração e músculo sóleo foram extirpadas visando à determinação de glicogênio, pelo método de Dubois et al. (1956).

3.6.4 Músculo sóleo

Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato, enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) [2-DG] e insulina (100 mU/mL), dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e gaseamento contínuo com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante, em banho-maria (37°C). Foi avaliada a captação de glicose, utilizando-se a 2-DG como marcador e medindo-se a radioatividade do [^3H] com auxílio de contador de partículas beta (NUNES et al., 2005).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA). Quando necessário foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls, com nível de significância pré-estabelecido em 5%.



- Peso corporal, comprimento focinho-ânus e ingestão alimentar;
- Teste de tolerância à glicose (GTT)/Teste de tolerância à insulina (ITT);
- Capacidade aeróbia pela determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL);
- Concentrações séricas de glicose, colesterol total, triglicérides, LDL e HDL;
- Captação de glicose pelo músculo sóleo isolado;
- Concentração de glicogênio no sóleo, coração e fígado
- Concentração de lipídios totais do tecido adiposo das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior;

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos, que compõem esta Dissertação de Mestrado encontram-se apresentados na forma de Três Artigos Científicos já concluídos. Esses artigos compõem os três capítulos seguintes desta dissertação

Capítulo 1: GHEZZI, A. C.; et al. Marcadores da síndrome metabólica em ratos wistar de diferentes idades. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 4:16, 2012.

A versão publicada encontra-se no anexo 1.

Capítulo 2: Ghezzi, A. C; et al. Capacidade aeróbia de ratos (*rattus norvegicus albinus*, *wistar*) em diferentes idades: efeitos do treinamento físico. Submetido para publicação para “**Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**”. A versão para a língua inglesa encontra-se no anexo 2.

Capítulo 3: Ghezzi, A. C; et al. Capacidade aeróbia e metabolismo muscular da glicose em ratos idosos treinados na máxima fase estável de lactato. Submetido para publicação para “**Mechanisms of Agein and Develolpment**.” A versão para a língua inglesa encontra-se no anexo 3

Resultados obtidos em estudo piloto efetuado previamente a esse projeto, que já foram publicados encontram-se no anexo 4.

Referência: GHEZZI, A. C.; et al. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 3, 2011.

Parecer do comitê de ética no anexo 5

4.1 CAPÍTULO 1:

MARCADORES DA SÍNDROME METABÓLICA EM RATOS WISTAR DE DIFERENTES IDADES

Resumo

A Síndrome Metabólica, nas últimas décadas, tornou-se um problema de saúde pública ao redor do mundo. Estudos longitudinais em humanos apresentam limitações quanto ao caráter invasivo de certas análises, ao tamanho e à aleatoriedade da amostra. Com isto, modelos animais capazes de mimetizar as respostas fisiológicas humanas podem auxiliar na investigação desta doença. Nesse contexto, o presente estudo foi delineado para analisar marcadores da síndrome metabólica em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, em diferentes idades. Os animais foram avaliados aos dois (idade jovem), quatro (idade adulta jovem), seis (idade adulta) e doze meses (maturidade) de idade quanto a: tolerância à glicose (teste de tolerância à glicose); sensibilidade à insulina (teste de tolerância à insulina); concentrações séricas de jejum de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-C e LDL-C, captação de glicose pelo músculo sóleo isolado e concentração de lipídios totais no tecido adiposo das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior. O envelhecimento originou sinais da síndrome metabólica nos ratos Wistar. Esses animais apresentaram, na maturidade, aumento significativo do peso corporal, associado ao incremento no conteúdo de lipídios totais no tecido adiposo nas regiões avaliadas, bem como elevação na concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e LDL-C, caracterizando dislipidemia. Também tiveram aumento da glicose sérica, quando comparados aos grupos mais jovens. Assim sendo, ratos Wistar em processo de envelhecimento parecem um modelo interessante para o estudo das alterações desencadeadas pela síndrome metabólica.

Palavras-chave: Síndrome Metabólica, parâmetros bioquímicos, metabolismo, envelhecimento, ratos, wistar

Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) caracteriza-se por um agrupamento de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes, geralmente ligados à resistência à insulina e à obesidade central (DUNCAN & SCHIMIDT, 2001). Doença cardiovascular é a maior causa de morbidade e de mortalidade mundial (OMS, 2005) por isso é de grande importância o estudo da Síndrome Metabólica como preditora de problemas cardiovasculares.

Com a idade há um aumento da prevalência de doenças cardiovasculares, o que é de grande preocupação, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida da população. O envelhecimento da população mundial tem causado preocupações quanto ao equilíbrio da pirâmide etária. Estima-se que, a proporção de pessoas acima de 65 anos aumente de 5,2% em 1950 para 15,6% em 2050, fazendo com que, os idosos representem um quinto da população mundial (IBGE, 2002).

A prevalência da Síndrome Metabólica na população dos Estados Unidos é de 20 a 25%, e de cerca de 55% na população idosa (FORD et al. 2002). No Brasil, foi observada uma prevalência de SM em 52,3% dos idosos, porém, devido a diferentes definições para a Síndrome Metabólica, a prevalência pode diferir entre os estudos (PEDRO, 2008).

A definição mais utilizadas para a Síndrome Metabólica é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), na qual é imprescindível a presença da diabetes ou resistência à insulina e duas das seguintes características: elevada razão cintura/quadril, concentrações elevadas de triglicerídeos ou baixa concentração de HDL-C, pressão arterial e excreção urinária de albumina elevadas (OMS, 1999). A International Diabetes Federation define a Síndrome Metabólica com a obesidade central, sendo o fator primordial. Em estudos que utilizaram essa definição como parâmetro, a prevalência de Síndrome Metabólica foi maior, principalmente entre idosos, pois essa população tem um ganho de peso corporal significativo com o passar da idade, devido à diminuição do metabolismo basal, entre outras causas.

O crescimento do número de idosos é um dos principais fatores para o aumento da prevalência da SM na população mundial (DOMINGUEZ et al., 2007), já que o envelhecimento aumenta os fatores de risco que caracterizam a doença. Além disso, a incidência de doenças como a obesidade tem aumentado entre os jovens (SOUZA et al. 2007). Adolescentes obesos tendem a apresentar maiores riscos para o desenvolvimento da Síndrome Metabólica do que os sobrepesados, o que pode indicar maiores incidências de doença cardiovascular nas próximas décadas (SOUZA et al. 2007)

Devido à ausência de consenso entre as propostas para o diagnóstico da Síndrome Metabólica, as prevalências variam de 4,2% a 32% em crianças e adolescentes (SILVA et al., 2005).

Em função das limitações que envolvem os estudos com seres humanos, grande parte da compreensão sobre a etiologia das características da SM é proveniente de estudos utilizando modelos animais.

Pesquisas utilizando modelos que desenvolvem um quadro completo de Síndrome Metabólica, incluindo todos os distúrbios acima mencionados, são raras. Foi demonstrado que a linhagem de ratos Wistar Ottawa Karlsburg (WOKW) desenvolve geneticamente quadro quase completo da Síndrome Metabólica com obesidade, moderada hipertensão, dislipidemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia (VAN DEN BRANDT et al., 2000a).

Outra situação que conduz à manifestação de sinais da Síndrome Metabólica, também em roedores, é o envelhecimento e sabe-se que, tal manifestação difere entre as linhagens de ratos. Por exemplo, o rato Fisher 344, que tem sido bastante usado em estudos que avaliam separadamente aspectos da síndrome metabólica, (FINK et al., 1986, KERN et al., 1992, BARNARD et al., 1992, CARTEE et al., 1993, MATTHAEI et al., 1990), mostra pequeno aumento do peso corporal aos 24 meses de idade. Nessa linhagem, os adipócitos aumentam marcadamente de tamanho e as concentrações plasmáticas de insulina são ligeiramente elevadas em ratos idosos. Ratos wistar com 24 meses de idade apresentam insulinemia semelhante àquela de ratos adultos com três meses (CARRASCOSA et al., 1989), apesar do grande aumento do peso corporal e da hiperplasia dos adipócitos (NEWBY et al., 1990) bem como, do decréscimo da captação periférica de glicose (ESCRIVA et al., 1997) com o envelhecimento. Ainda, estudos recentes destacam que as condições consideradas “padrão” para a manutenção de roedores de laboratório em geral, exemplo, gaiolas coletivas, contendo 2 a 5 animais por gaiola, em espaço coberto com serragem e com livre acesso ao alimento, podem favorecer o desenvolvimento da Síndrome Metabólica em ratos e camundongos. Isso poderia torná-los modelos adequados da obesidade humana (MARTIN et al., 2010).

Contudo, são escassos os estudos que acompanham o desenvolvimento de marcadores variados da Síndrome Metabólica, decorrentes do envelhecimento em ratos da linhagem Wistar, muito usados em experimentos no Brasil e que têm sido empregados nos mais diferentes estudos do Laboratório de Nutrição, Metabolismo e Exercício, do Departamento de Educação Física, IB, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, SP (MOURA et al., 2008; MOTA et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2007; GOMES et al., 2005; CAMBRI et al., 2010; GHEZZI et al., 2011). Assim sendo, o presente estudo foi delineado

para analisar marcadores da Síndrome Metabólica em ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, em diferentes idades.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, com idade entre dois e doze meses. Os animais, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu, foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física – IB – UNESP – Rio Claro, São Paulo, Brasil. Os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina) e água ad libitum, e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (4 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro. Todos os procedimentos adotados com os animais foram submetidos e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (CEUA), sob o protocolo 2638.

Delineamento e Grupos Experimentais

Os animais foram avaliados quanto a marcadores da Síndrome Metabólica em diferentes idades:

Grupo 2 meses (n=8) – aos dois meses (idade jovem);

Grupo 4 meses (n=8) – quatro meses (idade adulta jovem);

Grupo 6 meses (n=8) – seis meses (idade adulta);

Grupo 12 meses (n=8) – aos doze meses (maturidade).

Avaliações prévias ao sacrifício

Avaliações gerais:

Todos os animais tiveram peso corporal, comprimento focinho-ânus e ingestão alimentar registrados uma vez por semana.

Ingestão alimentar =
$$\frac{\text{Ingestão diária de alimento (gramas)}}{\sum \text{do peso corporal dos ratos em cada gaiola (gramas)}} \times 100 \text{ g}$$

$\sum$ do peso corporal dos ratos em cada gaiola (gramas)

Teste de tolerância à glicose – GTT:

A tolerância à glicose dos animais foi avaliada pelo GTT. Este foi realizado com os animais na última semana do experimento, após 12 horas de jejum, quando uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 20% (2 g/Kg de peso) foi administrada aos ratos por meio de sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25µL, visando a determinação das concentrações glicose. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método glicose-oxidase. Os resultados foram analisados pela determinação das áreas sob as curvas de glicose durante o teste pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando-se o software ORIGIN.

Teste de Tolerância à insulina - ITT

A sensibilidade periférica à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT). Este foi realizado com os animais 48 horas após o GTT, quando uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de insulina cristalina (LILLY U 40) na dose de 30 UI/100g de peso foi administrada via subcutânea. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, visando à determinação das concentrações de glicose, pelo método da glicose-oxidase. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. A taxa de remoção de glicose (KITT) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $(0,0693/t_{1/2}) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue de nos momentos após a administração de insulina em que a glicose sérica decair (LUNDBAECK, 1962) empregando-se o software ORIGIN.

Sacrifício dos animais e obtenção de material biológico

Ao atingirem a idade pré-estabelecida, todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com CO₂, 48 horas depois da última avaliação "in vivo". Amostras de sangue foram coletadas para a separação do soro e dosagem de glicose,

triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, por métodos colorimétricos, utilizando kits comerciais.

Músculo sóleo

Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato, enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) [2-DG] e insulina (100 mU/mL), dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e gaseamento contínuo com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante, em banho-maria (37°C). Foi avaliada a captação de glicose, utilizando-se a 2-DG como marcador e medindo-se a radioatividade do [^3H] com auxílio de contador de partículas beta (NUNES et al., 2005).

Tecido adiposo

O tecido adiposo, das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior foi removido para determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As concentrações de lipídios desses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira (1990).

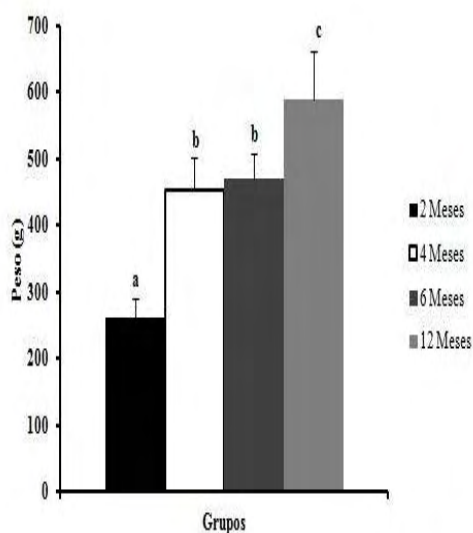
Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância pré-estabelecido em 5%. Quando necessário, foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls.

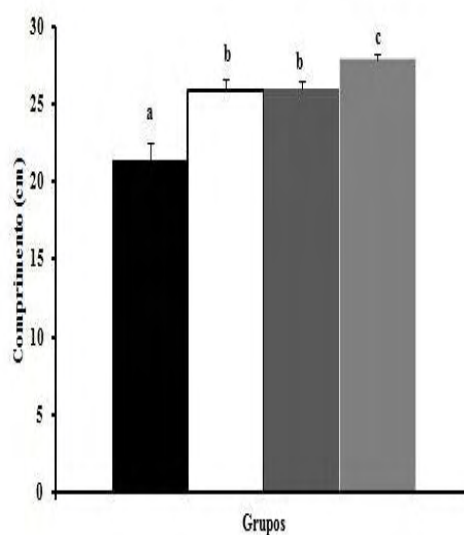
Resultados

A figura 1A, B e C mostra a evolução do peso corporal, comprimento focinho-ânus e a ingestão alimentar dos animais. Foram observadas diferenças significativas no peso e comprimento corporal. Entre os 2 e os 4 meses de vida, os ratos apresentaram aumentos significativos, tanto no peso corporal quanto no comprimento naso-anal. Aumento significativo adicional no peso corporal e no comprimento naso-anal ocorreu dos 6 aos 12 meses.

1A



B



C

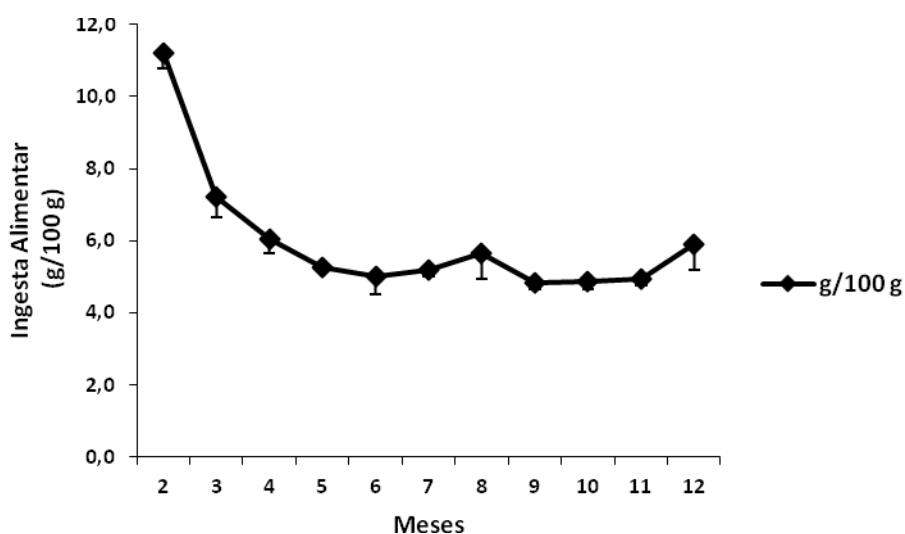


Figura 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo, do peso corporal (g) (A), comprimento naso-anal (cm) (B) e da ingesta alimentar (g/100 g) (C).

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $P < 0.05$).

A Figura 2 mostra os valores de glicemia e os valores de área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância a glicose (GTT). Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados.

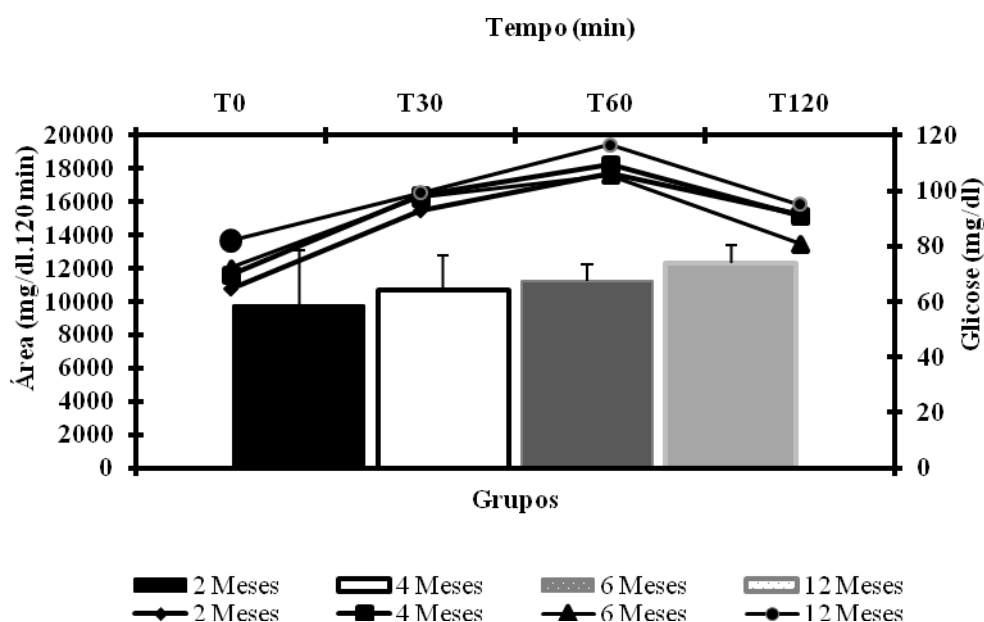


Figura 2: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de glicemia e área sob a curva dos valores de glicemia durante o teste de tolerância à glicose – GTT.

Nota: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way $p < 0,05$)

A Figura 3 mostra os valores de glicemia e a constante de remoção de glicose (KITT) durante teste de tolerância à insulina ITT. Não houve diferença estatística entre os grupos.

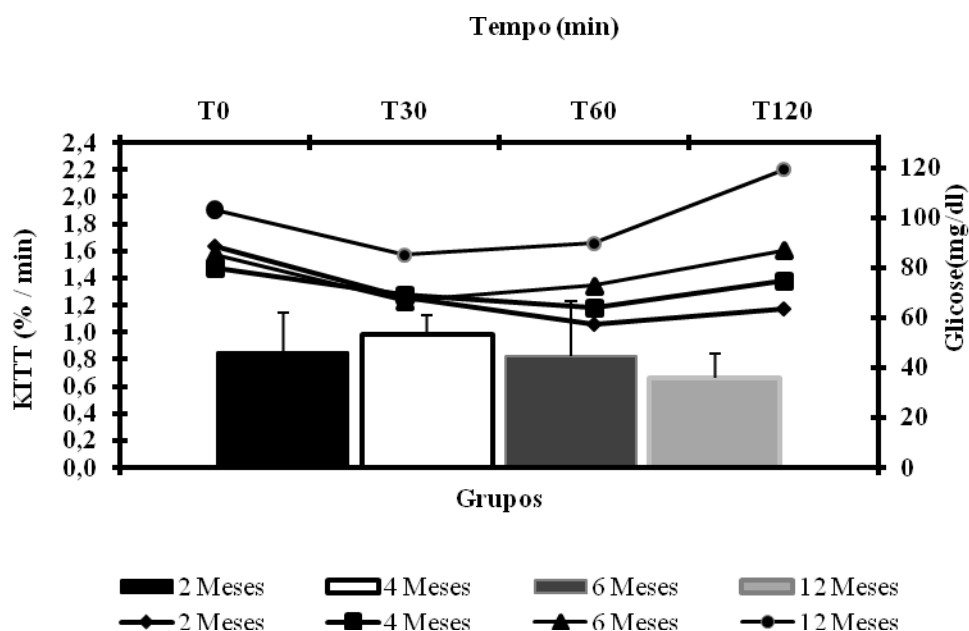


Figura 3-: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de glicemia e constante de remoção de glicose-KITT durante o teste de tolerância à insulina - ITT.

Nota: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way $p < 0,05$).

As variáveis séricas dos grupos ao final do experimento são apresentadas na Tabela 1. Foram encontradas diferenças significativas nas variáveis séricas dos animais aos 12 meses, com aumento significativo nas concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL, comparadas as demais idades.

Tabela 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores das concentrações séricas de glicose (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL (mg/dL) e LDL (mg/dL).

Grupos	Glicose	Triglicerídeos	Colesterol Total	HDL	LDL
2 Meses	98±14 ^a	105±30 ^a	82±7 ^a	29±8 ^a	64±8 ^a
4 Meses	109±8 ^a	100±11 ^a	100±10 ^a	48±4 ^a	67±3 ^a
6 Meses	119±29 ^a	125±33 ^a	100±8 ^a	40±6 ^a	63±8 ^a
12 Meses	152±29 ^b	260±83 ^b	171±30 ^b	79±25 ^b	92±19 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Na tabela 2 estão apresentados os dados da concentração de lipídios totais das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior. Foi evidenciada diferença estatística entre os grupos na gordura mesentérica e retroperitoneal. O grupo de 2 meses possui menor acúmulo de lipídios nessas regiões do que os outros grupos, enquanto que o grupo de 12 meses, possui maior acúmulo na região mesentérica.

Tabela 2: Média e desvio padrão da concentração de lipídios totais (mg/100g) no tecido adiposo de diferente regiões de 8 animais por grupo.

Groups	Mesentérica	Retroperitoneal	Subcutânea
2 Meses	1 005±240 ^a	770±212 ^a	692±177 ^a
4 Meses	2 267±726 ^b	2634±536 ^b	1 851±403 ^b
6 Meses	2475±537 ^b	2472±408 ^b	1 499±381 ^b
12 Meses	4399±643 ^c	3191±703 ^b	1 896±758 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Na figura 4 estão presentes os valores de captação de glicose pelo músculo sóleo isolado, não há diferença entre os grupos.

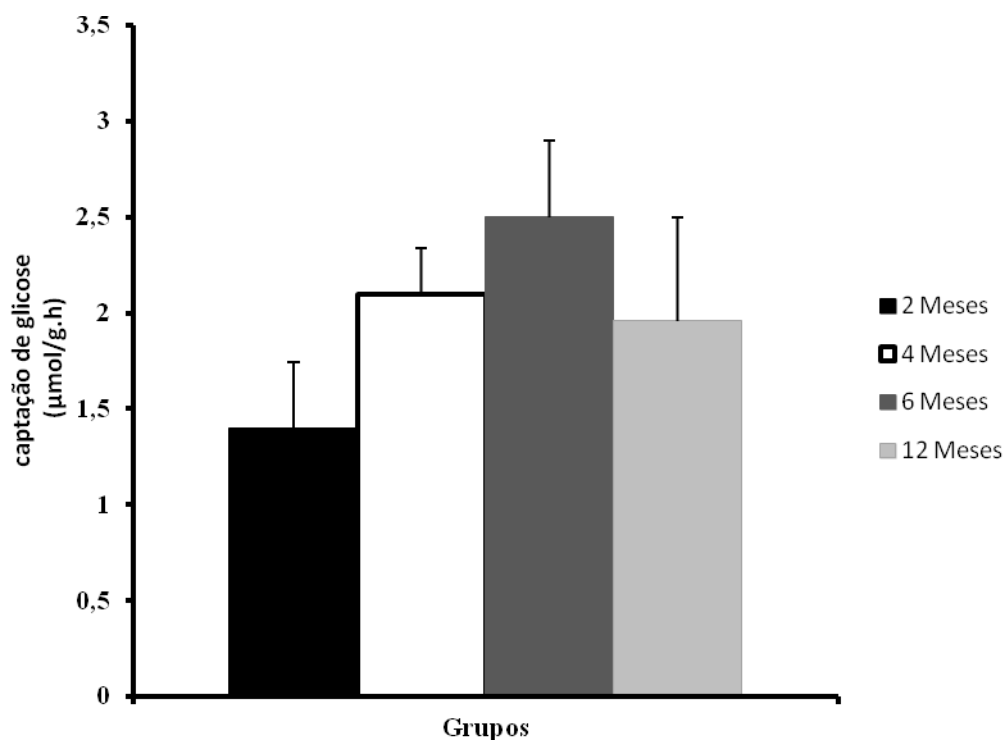


Figura 4: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo dos valores de captação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) pelo músculo sóleo isolado

Nota: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way $p < 0,05$).

Discussão

Esse estudo analisou o efeito do envelhecimento no desenvolvimento de alguns indicadores da Síndrome Metabólica em ratos da linhagem Wistar, muito utilizado em pesquisas no mundo e, principalmente, no Brasil.

A expectativa de vida da população tem aumentado devido ao desenvolvimento da medicina, melhora no saneamento básico, entre outros fatores. A longevidade vem acompanhada de várias doenças e uma que tem atraído grande atenção é a Síndrome Metabólica, pois a prevalência de casos na população tem aumentado de maneira exponencial (MEIGS et al., 2002). A Síndrome Metabólica consiste na associação de doenças que trazem risco para doenças cardiovasculares, que é a maior causa de mortes no mundo.

Diante desse quadro, há a necessidade de se entender os mecanismos da Síndrome Metabólica. Para isso, vários estudos têm sido realizados com modelos experimentais, pois as análises dos mecanismos da Síndrome Metabólica muitas vezes incluem procedimentos invasivos, de execução restrita em seres humanos. Entre os animais mais utilizados para o estudo dessa questão estão ratos e camundongos dentre eles, várias linhagens são empregadas.

No presente estudo, analisou-se ratos Wistar albinos e pode-se constatar que o grupo de 2 meses apresentou menor peso corporal quando comparado aos do grupo de 4, 6 e 12 meses. Os animais dos 2 meses aos 4 meses mostraram ganho de peso corporal acentuado devido à fase de crescimento e desenvolvimento em que se encontravam. Houve estabilização do peso corporal dos 4 aos 6 meses, porém houve novo incremento de peso significativo nos animais aos 12 meses, fato também observado por Lerco et al., (2003) e por Nereida Lima (1995) em ratos Wistar. O incremento ponderal foi associado a aumento no conteúdo de lipídios totais no tecido adiposo visceral em diferentes regiões.

Ford et al., (2002), usando critérios definidos pelo NCEP, verificaram que a prevalência da obesidade, bem como, da síndrome metabólica em humanos aumenta com a idade.

Como indicado pelos resultados do GTT e do ITT realizados aos 2, 4, 6 e 12 meses de idade, não houve alteração do comportamento glicêmico durante os testes ao longo do período examinado. Isso indica que tanto a tolerância à glicose quanto a sensibilidade à insulina foram preservadas. Tais resultados acham-se de acordo com a literatura prévia, onde foi relatado que ratos Wistar com 24 meses de idade apresentam insulinemia e glicemia semelhantes às de ratos adultos com três meses (CARRASCOSA et al., 1989), apesar do aumento do peso corporal e da hiperplasia dos adipócitos (NEWBY et al., 1990).

Já a bioquímica sanguínea dos animais sofreu alterações aos 12 meses, período em que pode-se observar aumento nos valores de triglicerídeos, colesterol total, LDL-C, caracterizando instalação do quadro de dislipidemia. Isso contrasta com o relatado por Mota et al. (2008). Contudo, nesse último estudo, os animais foram avaliados por um menor período de tempo, do desmame até os 120 dias de idade, isso pode explicar a diferença entre os estudos.

Outra alteração importante, constatada no presente estudo, foi o aumento da glicose sanguínea aos 12 meses, comparado às idades mais jovens. Em estudos com diabéticos idosos, foi constatado que esses indivíduos possuem maior risco do que os indivíduos não diabéticos de desenvolverem dislipidemia (FIGUEIRA et al., 1988).

Outro fator que tem sido associado com a SM é a gordura visceral. Em estudos como de Lerario et al., (2002), foi observado que a população nipo-brasileira possuía peso corporal normal, porém preenchia os outros critérios para a SM. Observou-se então que a quantidade de gordura visceral nos nipo-brasileiros era acentuada, o que poderia explicar os outros distúrbios. Nesse caso, a distribuição de gordura está mais ligada aos distúrbios metabólicos do que o peso corporal total e em indivíduos mais velhos isso é ainda mais expressivo. Portanto, gordura corporal central se mostra mais fidedigna para diagnosticar síndrome metabólica e outras morbidades do que a classificação em grau de obesidade.

Sendo a glicose importante substrato para a realização do trabalho muscular, é de interesse discutir o metabolismo muscular desse substrato durante o envelhecimento de ratos Wistar. Para isso, no presente trabalho foi avaliada a captação de glicose em músculo sóleo incubado, todavia não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Porém, a captação de glicose pelo músculo sóleo foi analisada com os animais em repouso, talvez fosse observada alterações se os animais estivessem expostos ao exercício físico agudo.

Em ratos, é conhecido que o envelhecimento causa o desenvolvimento espontâneo da obesidade e resistência à ação da insulina (MACHADO et al., 1994). Alguns estudos demonstram alterações no conteúdo de GLUT 4 em ratos idosos, contudo, esses estudos tratam de diferentes linhagem de animais e músculos analisados (LIN et al., 1991; GULVE et al., 1993).

Conclusão:

O envelhecimento originou características da Síndrome Metabólica em ratos Wistar. Esses animais apresentaram, na maturidade, aumento significativo de peso corporal e do conteúdo de lipídios totais no tecido adiposo, bem como, dislipidemia, com elevação na concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e LDL colesterol. Do mesmo modo, apresentaram aumento da glicose sérica quando comparados aos grupos mais jovens. Assim sendo, ratos Wistar em processo de envelhecimento parecem um modelo interessante para o estudo das alterações desencadeadas pela Síndrome Metabólica.

Referências

1. BARNARD, R. J.; LAWANI, L. O.; MARTIN, D. A.; YOUNGREN, J. F.; SINGH, R.; SCHECK, S. H. Effects of maturation and aging on the skeletal muscle glucose transport system. **Am J Physiol**, v. 262, p. E619–E626, 1992.
2. CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; RIBEIRO, C.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Nutr Res**, v.30, p.156 - 162, 2010.
3. CARRASCOSA, J. M.; RUIZ, P.; MARTINEZ, C.; PULIDO, J. A.; SATRU, S. J.; ANDRES, A. Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 160, p. 303–309, 1989.
4. CARTEE, G. D.; BRIGGS-TUNG, C.; KIETZKE, E. W. Persistent effects of exercise on skeletal muscle glucose transport across the life-span of rats. **J Appl Physiol**, v. 75, p. 972–978, 1993.
5. CINTI, S. The adipose organ . **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, p. 9–15, 2005.
6. DOMINGUEZ, L. J.; BARBAGALLO, M. The cardiometabolic syndrome and sarcopenic obesity in older persons. **J Cardiometab Syndr.**, v. 2, p. 183-189, 2007.
7. DUNCAN BB, SCHIMIDT MA. Chronic ativation of th innate immune sistem may underlie the metabolic sindrome. **São Paulo Med J**, v. 119, p. 122-127, 2001.
8. ESCRIVA, E.; AGOTE, M.; RUBIO, E. J.; MOLERO, J. C. A.; PASCUAL-LEONE, A. M.; ANDRES, S. A. J.; SATRUSTEGUI, J.; CARRASCOSA, J. M. In Vivo Insulin-Dependent Glucose Uptake of Specific Tissues Is Decreased during Aging of Mature Wistar Rats. **Endocrinology**, v. 138, p. 49–54, 1997.
9. FIGUEIRA, J. L.; CARVALHO, E. T. F.; PAPALÉO, M, N.; PASINI, U.; THOMSEN, Y. G.; ANDRIOLLO, A. Alterações lipídicas em idosos portadores de diabetes melito não insulinodependente/ Lipid changes in elderly individuls with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Rev. paul. med**, v. 106, p. 89-94, 1998.
10. FINK, R. I.; HUECKSTEADT, T.; KARAOGHLANIAN, Z. The effects of aging on glucose metabolism in adipocytes from Fisher rats. **Endocrinology**, v. 118, p. 1139–1147, 1986.

11. FORD ES, GILES WH, DIETZ WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: finding from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, v. 287, p. 356–359, 2002.
12. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; RIBEIRO, C.; Botezelli.J.D.; MELLO, M. A. R. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats.. **Lipids in health dis**, v.10, p.3 - , 2011.
13. GOMES, R. J.; CAETANO, F. H.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. **J exerc physiol online**, v. 8, p. 16-25, 2005.
14. GULVE, E. A.; HENRIKSEN, E. J.; RODNICK, K. J.; YOUN, J. H.; HOLLOSZY, J. O. Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1- to 25-mo-old rats. **Am J Physiol**, v. 264, p. E319-27, 1993.
15. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios. 2002. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>. Acesso em: 05, jun. 2010.
16. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). The IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. 2006. Acessado em: 30 Abr.2010. Disponível em: <http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429.9>.
17. KERN, M.; DOLAN, P. L.; MAZZEO, R. S.; WELLS, J. A.; LYNIS, D. G. Effect of aging and exercise on GLUT-4 glucose transporters in muscle. **Am J Physiol**, v. 263, p. E362–E367, 1992.
18. LERARIO, D. D. G.; GIMENO, S. G.; FRANCO, L. J.; IUNES, M.; FERREIRA, S. R. G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, p. 1, 2002
19. LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, A. S.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18, p. 132-142, 2003.
20. LIMA N. K. C. Sobrecarga Salina Crônica Em Ratos Wistar Eleva A Pressão Arterial e Aumenta O Metabolismo da Glicose, Sem Modificar A Sensibilidade À Insulina. 1995. Doutorado em Medicina (Nefrologia). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

21. LIN, J. L.; ASANO, T.; SHIBASAKI, Y.; TSUKUDA, K.; KATAGIRI, H.; ISHIHARA, H.; TAKAKU, F.; OKA, Y. Altered expression of glucose transporter isoforms with aging in rats selective decrease in GluT4 in the fat tissue and skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 34, p. 477-82, 1991.
22. LUNDBAECK, K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 1507-1513, 1962.
23. MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol Behav**, v. 55, p. 621-5, 1994.
24. MARTIN, B.; JI, S.; MAUDSLEY, S.; MATTSON, M. P. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. **PNAS**, v. 107, p. 6127- 6133, 2010.
25. MATHEWS, J. N. S.; ALTAMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br Med J**, v. 27, p. 230-5, 1990.
26. MATTHAEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H. H.; HAMANN, A.; KREYMANN, G.; GRETEN, H. Potential mechanism of insulin resistance in ageing: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of the intracellular pool of glucose transporters in Fisher rat adipocytes. **J Endocrinol**, v. 126, p. 99–107, 1990.
27. MEIGS, J. B. Epidemiology of the metabolic syndrome. **Am J Manag Care**, v. 8, p. S283-92, 2002.
28. MOTA, C. S. A.; RIBEIRO, C.; ARAUJO, G. G.; ARAUJO, M. B.; MANCHADO, F. B.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. **BMC Endocr Disord (Online)**, v. 8, p. 1-9, 2008.
29. MOURA, R. F.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; STEVANATO, E.; MELLO, M. A. R. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **Br J Nutr.**, v. 101, p. 1178–1184, 2009.
30. NEWBY, F. D.; DIGIROLAMO, M.; COTSONIS, G. A.; KUTNER, M. H. Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 259, p. 1117-1125, 1990.
31. NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. **Métodos de bioquímica clínica**, p. 153-168, 1990.

32. NUNES, W. M. S.; MELLO, M. A. R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 541-548, 2005.
33. OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO, E.; MARCONDES, M. C. C. G.; MELLO, M. A. R. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **J Diabetes its Complicat**, v. 21, p. 258 – 264, 2007.
34. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Prevenção de doenças crônicas um investimento vital. 2005.
35. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS): Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, WHO, 1999.
36. PEDRO, R. E. L. Relação entre o número de dentes, medidas antropométricas e síndrome metabólica nos idosos de Porto Alegre. 2008. Dissertação (mestrado em gerontologia biomédica). Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
37. SILVA, R. C. Q.; MIRANDA, W. L.; CHACRA, A. R.; DIB, A. S. Metabolic syndrome and insulin resistance in normal glucose tolerant brazilian adolescents with family history of type 2 diabetes. **Diabetes Care.**, v. 28, p. 716-8, 2005.
38. SOUZA, M. S. F.; LEME, R. B.; FRANCO, R. R.; ROMALDINI, C. C.; TUMAS, R.; CARDOSO, A. L.; DAMIANI, D. Síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Rev Paul Pediatr.**, v. 25, p. 214-220, 2007.
39. VAN DEN BRANDT, J.; KOVACS, P.; KLOTING, I. Metabolic features in disease-resistant as well as in hypertensive SHR and newly established obese WOKW inbred rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, p. 1618 – 1622, 2000a.

4.2 CAPÍTULO 2:

CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*, WISTAR) EM DIFERENTES IDADES: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

Resumo

O envelhecimento da população mundial tem causado preocupações quanto ao equilíbrio da pirâmide etária. É um processo natural no qual ocorre diminuição das funções fisiológicas. A prática regular de exercícios físicos, tanto a curto como a longo prazo, promove benefícios pela redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares que representam, na atualidade, uma das principais causas de morte em países desenvolvidos. Diante disso, o objetivo do trabalho foi analisar a capacidade aeróbia pela determinação da máxima fase estável de lactato e os efeitos do treinamento e destreinamento de natação (80% da MFEL), em ratos de linhagem Wistar, variação *albinus*, aos dois (idade jovem), quatro (idade adulta jovem), seis (idade adulta) e doze meses de vida (maturidade). Verificou-se aumento de peso corporal nos animais de 12 meses sedentário e destreinado, porém no grupo 12 meses treinado, houve uma manutenção do peso corporal, quanto a carga da MFEL houve diminuição com o envelhecimento, porém o exercício físico conseguiu atenuar as perdas na capacidade aeróbia exercida pela idade e não houve alteração na concentração de lactato sanguíneo durante exercício para nenhum dos grupos. Portanto pode-se concluir que o envelhecimento causa declínio na capacidade aeróbia de animais sedentários, porém o exercício físico pode diminuir os efeitos deletérios da idade e ainda prevenir a obesidade.

Palavras chaves: Envelhecimento, doenças metabólicas, máxima fase estável de lactato (MFEL), exercício físico, peso corporal.

Introdução

O envelhecimento da população mundial tem causado preocupações quanto ao equilíbrio da pirâmide etária. Estima-se que, a proporção de pessoas acima de 65 anos aumente de 5,2% em 1950 para 15,6% em 2050, fazendo com que, os idosos representem um quinto da população mundial (IBGE, 2002). Esse aumento da expectativa de vida é efeito dos avanços tecnológicos na área da saúde.

As alterações na pirâmide etária atraem a atenção para a saúde pública, pois o envelhecimento é um processo natural no qual ocorre diminuição das funções fisiológicas, especialmente a partir da terceira década de vida, quando se inicia um progressivo declínio da capacidade funcional, cuja velocidade de mudança é dependente de fatores genéticos, condições de saúde e estilo de vida do indivíduo (POLLOCK et al., 1976).

A abordagem de um estilo de vida saudável tem sido feita em todas as idades, porém durante o processo de envelhecimento isso tem sido ainda mais enfatizado. Um estilo de vida saudável tem sido idealizado em diversos âmbitos, contudo, pode-se resumir como sendo composta por uma alimentação equilibrada e uma vida ativa fisicamente (HAVEMAN-NIES et al., 2003).

A literatura é consistente ao afirmar que exercícios físicos ocasionam uma série de benefícios para o organismo como, controle de peso corporal (CARPENTER et al., 2012; MILLER et al., 2012), com diminuição da massa gorda e aumento da massa magra, o que pode atuar diminuindo o LDL colesterol e o colesterol total, assim como aumentando o HDL colesterol (GUEDES et al., 2007; KELLEY et al., 2005). o exercício físico reduz glicemia, melhorando a responsividade da musculatura à ação da insulina (KARTZEL et al., 1995). Auxilia também na melhora da capacidade aeróbia e no controle da pressão arterial (WAREMAN et al., 2000; DE SOUZA et al., 2000), estendendo os benefícios aos fatores psicológicos (doenças como depressão) e sociais (aumentando o círculo de amigos) (CAMACHO et al., 1991) .

Níveis adequados de aptidão cardiorrespiratória estão diretamente relacionados com a promoção de efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares, e inversamente associados com variáveis de riscos cardiovasculares e metabólicos (TWISK et al., 2002).

A prática regular de exercícios físicos, tanto a curto como a longo prazo, principalmente de características aeróbias, promove benefícios pela redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (BLAIR et al., 1999), que representam, na atualidade, uma das principais causa de morte em países desenvolvidos no mundo, tanto em homens como em mulheres (VARADAY et al., 2004).

O exercício físico ocasionará maiores benefícios para a saúde do indivíduo se for prescrito de forma individualizada, respeitando os objetivos e a capacidade física, independente de qual agravo metabólico esse indivíduo possuir (CIOLAC et al., 2004).

Diante disso a atividade física tem sido incluída no cotidiano do idoso. Por isso, é de grande interesse constatar as mudanças fisiológicas que ocorrem nesses indivíduos quanto à capacidade aeróbia e, para isso, a melhor maneira seria utilizar o teste para determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL), que é o padrão ouro para determinação de predominância energética em exercício físico de carga constante.

Diversos estudos (CAMBRI et al., 2010a; CAMBRI et al., 2011b; GHEZZI et al., 2011) têm sido realizados, com modelo experimental, a fim de entender melhor as alterações que ocorrem no organismo frente ao exercício físico e ao envelhecimento, pois muitas análises são invasivas ou não são totalmente seguras para serem efetuadas em seres humanos. Além disso, estudos longitudinais de muito longa duração são muito difíceis de serem executados em seres humanos. Contudo, o importante é que uma série de pesquisas tem sido feitas nesse sentido.

Doenças humanas têm sido simuladas em animais de laboratório (CAMBRI et al., 2010b; GHEZZI et al., 2011; BOTEZELLI et al., 2010) para que fosse possível observar de maneira mais clara quais as alterações que ocorrem, seja em nível molecular, seja em nível sistêmico. Assim, é de grande interesse sabermos como a atividade física atua na melhora de diversas patologias bem como a intensidade mais adequada do exercício físico a ser empregada para atuar de maneira a prevenir ou a tratar doenças é de extrema importância.

Diante disso o objetivo do trabalho foi analisar em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, variação *albinus*, aos dois (idade jovem), quatro (idade adulta jovem), seis (idade adulta) e doze meses de vida (maturidade):

- Capacidade aeróbia pela determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL);
- Efeitos do treinamento e destreinamento de natação, na intensidade de 80 % da máxima fase estável de lactato, iniciado na idade adulta jovem (quatro meses) no peso corporal, capacidade aeróbia e somatório das gorduras totais das regiões mesentérica, subcutânea e retroperitoneal.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus, com idade entre dois e doze meses. Os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina) e água ad libitum, e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (4 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro. Todos os procedimentos adotados com os animais foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (CEUA), sob o protocolo 2638.

Delineamento e Grupos Experimentais

Os animais foram avaliados quanto à capacidade aeróbia em diferentes idades:

Grupo 2S (n=8) – aos dois meses (idade jovem);

Grupo 4S (n=8) – aos quatro meses (idade adulta jovem);

Grupo 6S (n=8) – aos seis meses (idade adulta);

Grupo 12S (n=8) – aos doze meses sedentários (maturidade);

Grupo 12T (n=8) – submetidos ao treinamento físico iniciado na idade adulta jovem (quatro meses de idade), mantidos até o final do estudo (doze meses de idade) e avaliados aos doze meses;

Grupo 12D (n=8) – submetidos ao treinamento físico iniciado na idade adulta jovem (quatro meses de idade), com duração de quatro meses (interrompido aos oito meses de idade) e avaliados aos doze meses.

Peso corporal e somatório das gorduras das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea.

O peso corporal foi registrado uma vez por semana durante todo o experimento. A excisão da gordura das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea foi realizada de acordo com métodos descritos por Cinti (2005). Realizou-se a somatória dos pesos das gorduras das regiões mesentérica, retroperitoneal e subcutânea posterior.

Treinamento Físico

Os animais dos grupos treinados (12T e 12D) foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a 30 ± 2 graus, 1 hora por dia, 5 dias por semana, suportando sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, equivalente a 80% da carga na zonas da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual, identificada pela máxima fase estável de lactato. De dois em dois meses esses animais foram reavaliados quanto à máxima fase estável de lactato para reajuste das cargas de treinamento.

Máxima Fase Estável de Lactato - MFEL

A identificação de zonas de transição metabólica durante exercício de natação e a avaliação da capacidade aeróbia dos animais foram efetuadas pelo protocolo de máxima fase estável de lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios físicos com cargas constantes (HECK et al., 1985). Sua determinação tem se mostrado útil na prescrição de exercícios físicos e na avaliação da capacidade aeróbia. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um protocolo para a determinação da MFEL para ratos durante exercício de natação (GOBATTO et al., 2001), que foi usado no presente estudo.

Resumidamente, os animais foram submetidos a vários testes de natação suportando sobrecargas constantes e crescentes em relação ao peso corporal, com intervalos de 48 horas entre eles, até que não foi mais possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício físico. Cada teste consistiu de 25 minutos de natação contínua suportando uma carga, com coleta de sangue, por pequeno corte na extremidade da cauda a cada 5 minutos para a determinação das concentrações de lactato. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em analisador de lactato (modelo YSI 1500 Sport, YellowSprings, OH, EUA). O critério de estabilização empregado foi diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 25 minutos de exercício.

Fígado, coração e sóleo

Alíquotas do fígado, coração e sóleo foram extirpadas visando a determinação das concentrações de glicogênio, pelo método de Dubois et al., (1956).

Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA two-way), com nível de significância pré-estabelecido em 5%. Quando necessário, foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls.

Resultados

Na tabela 1 estão apresentados os dados do peso corporal (g), na qual se pode observar que o peso corporal aumenta até os 4 meses com posterior estabilização até aos 6 meses, aos 12 meses, nos grupos sedentário e destreinado, o peso volta a aumentar. Já no grupo 12 meses treinado, houve uma manutenção do peso corporal até o final do experimento. O somatório das gorduras totais das regiões mesentérica, retroperitonal e subcutânea são também apresentados na Tabela 1. Observou-se que os animais de dois meses tem menos gordura do que todos os grupos, um fato interessante é que os animais de 12 meses treinado têm menor gordura nessas regiões do que os grupos de 12 meses destreinado e 12 meses sedentário.

Tabela 1: Valores da média e desvio padrão do peso corporal (g) e somatório das gorduras totais das regiões mesentérica, subcutânea e retroperitonal (g/100mg).

Grupos	Peso Corporal	Somatório*
2S	269±10 ^a	18486±291 ^a
4S	455±14 ^b	43789±550 ^b
6S	471±37 ^b	44151±638 ^b
12 S	588±71 ^c	51314±994 ^c
12 T	515±72 ^b	38837±849 ^b
12 D	576±62 ^c	55598±1176 ^a

*Somatório = somatório das gorduras totais das regiões mesentérica, retroperitonal e subcutânea posterior.

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA Two-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Grupo 2S – aos dois meses sedentários; **Grupo 4S** – aos quatro meses sedentários; **Grupo 6S** – aos seis meses sedentários; **Grupo 12S** – aos doze meses sedentários; **Grupo 12T** – aos 12 meses treinados; **Grupo 12D** – aos 12 meses destreinados.

Na figura 1 estão apresentados os dados da carga de trabalho na qual foi encontrada a máxima fase estável de lactato, onde pode-se observar que a carga diminui com o envelhecimento, porém o exercício físico conseguiu atenuar as perdas na capacidade aeróbia exercida pela idade, pois os animais de 12 meses treinados e destreinados possuem uma carga relativa à MFEL maior do que a dos animais de 12 meses sedentários.

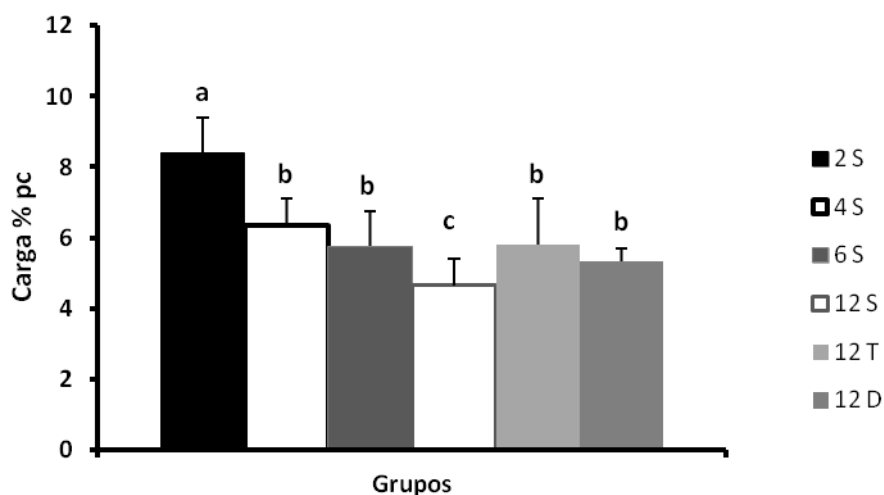


Figura 1: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo da carga (% em relação ao peso corporal) na qual foi encontrada à Máxima Fase Estável de Lactato.

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA Two-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Grupo 2S – aos dois meses sedentários; **Grupo 4S** – aos quatro meses sedentários; **Grupo 6S** – aos seis meses sedentários; **Grupo 12S** – aos doze meses sedentários; **Grupo 12T** – aos 12 meses treinados; **Grupo 12D** – aos 12 meses destreinados.

A figura 2 mostra os valores médios de concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) durante exercício na carga equivalente à máxima fase estável de lactato, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos.

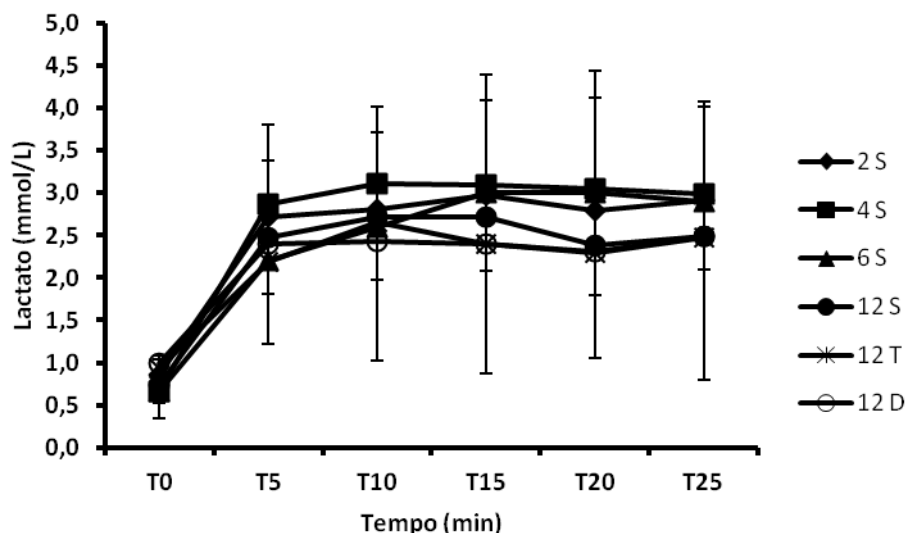


Figura 2: Média e desvio padrão de 8 animais por grupo da concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) durante exercício na carga equivalente à máxima fase estável de lactato.

Nota: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way $p < 0,05$).

Grupo 2S – aos dois meses sedentários; **Grupo 4S** – aos quatro meses sedentários; **Grupo 6S** – aos seis meses sedentários; **Grupo 12S** – aos doze meses sedentários; **Grupo 12T** – aos 12 meses treinados; **Grupo 12D** – aos 12 meses destreinados.

Discussão

A atividade física tem um papel fundamental na prevenção e tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas e contribui para o aumento da expectativa de vida, melhorando a capacidade funcional do indivíduo e refletindo em uma melhora nas atividades de vida diária.

Níveis adequados de aptidão cardiorrespiratória estão diretamente relacionados com a promoção de efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares, e inversamente relacionados com variáveis de risco cardiovascular e metabólico (TWISK et al., 2002).

A prática regular de exercícios físicos, tanto a curto, como a longo prazo, principalmente de características aeróbias, promove benefícios, pela redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (BLAIR et al., 1999), que representam, na atualidade, uma das principais causas de morte em países desenvolvidos, tanto em homens como em mulheres (VARADAY et al., 2004).

O exercício físico trará maiores benefícios para a saúde do indivíduo se for prescrito de forma individualizada, respeitando os objetivos e a capacidade física, independente de qual agravo metabólico esse indivíduo possuir (CIOLAC et al., 2004).

Pode-se observar em nossos resultados que o peso corporal dos animais sofreu alterações. Houve um ganho de peso corporal nos animais após os 2 meses, o que é normal devido a fase de crescimento desses animais. Posteriormente aos 12 meses nos animais sedentários e destreinados pode-se verificar um novo incremento de peso corporal, esse mais relacionado com o ganho de massa gorda, como demonstrado pelo somatório das gorduras mesentérica, retroperitonal e subcutânea já que esses animais não praticavam atividade física e também não estavam em fase de crescimento. A literatura apresenta que o treinamento físico é eficaz em manter ou ainda diminuir o peso corporal (EGUCHI et al., 2008; PELLIZZON et al., 2002). Corroborando com esses dados, os animais de 12 meses treinados mostraram uma manutenção do peso corporal, realçando o efeito benéfico do exercício físico para manutenção do peso corporal, o que é de grande interesse para a população idosa, já que a obesidade está ligada diretamente com uma série de distúrbios metabólicos.

Os benefícios do exercício físico de forma contínua e regular se destacam quando comparamos o peso corporal do grupo 12 meses treinado e destreinado, sendo que o peso corporal dos animais destreinados se mostra maior do que dos animais treinados. Portanto, o gasto calórico devido ao exercício físico se mostra altamente relevante.

Segundo os resultados encontrados no presente estudo, a carga de trabalho referente à MFEL sofreu um declínio com o envelhecimento. Isso mostra a importância da realização de

uma avaliação física antes de iniciar exercício físico e que haja um constante monitoramento da capacidade aeróbia com o fim de treinamento.

No presente trabalho a carga da MFEL variou de 8 a 5 % de peso corporal, sendo que o envelhecimento diminuiu a carga relativa à MFEL. Porém o treinamento físico foi eficiente em manter a capacidade aeróbia, mesmo após o destreinamento, pois os animais treinados e destreinados tiveram carga semelhante aos animais de 4 e 6 meses, ao passo que os animais sedentários apresentaram redução da capacidade aeróbia (carga na MFEL) com a idade.

No estudo de Cunha et al. (2009), que também trabalharam com ratos aos 12 meses, a carga relativa à MFEL foi detectada a 5,4 % do peso corporal para animais não treinados, demonstrando portanto concordância com o presente estudo, que constatou a MFEL em 5,1 % do peso corporal para os animais não treinados. O mesmo ocorreu para a concentração de lactato, que apresentou comportamento similar em ambos os estudos.

Mattern et al., (2003) ao testarem a hipótese de que a idade reduz a capacidade aeróbia, avaliaram sujeitos treinados de faixas etárias, jovens, adultos até 50 anos e homens com mais de 50 anos e confirmaram que realmente ocorre uma diminuição da carga relativa à MFEL com a idade, sem alterações para as concentrações de lactato sanguíneo entre as faixas etárias. O mesmo ocorreu no presente trabalho para ambas as variáveis.

Em um estudo com humanos, Takeshima et al., (1996) constataram que o VO_{2max} é maior para sujeitos idosos treinados quando comparados com os destreinados, demonstrando a capacidade do treinamento físico em reduzir a perda da capacidade aeróbia induzida pela idade.

Uma possível explicação encontrada para a diminuição da MFEL com a idade pode estar relacionada ao envelhecimento e o prejuízo na via de gliconeogênese e redução transportadores de lactato (BOIS-JOYEUX et al., 1990), e que o treinamento interfere de alguma maneira nessa via.

Portanto, pode-se concluir que o envelhecimento ocasiona declínio na capacidade aeróbia de animais sedentários, porém o exercício físico pode diminuir os efeitos deletérios da idade e ainda prevenir a obesidade, o que é de grande interesse, pois a capacidade aeróbia tem sido relacionada com uma vida saudável. Quanto maior a aptidão cardiorrespiratória menor a incidência de doenças metabólicas, como a obesidade e agravos de doenças cardiovasculares (TWISK et al., 2002).

Referências

1. BLAIR, S. N.; BRODNEY, S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, p. S646-62, 1999.
2. BOIS-JOYEUX, B.; CHANEZ, M.; PERET, J. Age-dependent glycolysis and gluconeogenesis enzyme activities in starved-refed rats. **Diabetes Metab**, v.16, p. 504-512, 1990.
3. BOTEZELLI, J. D.; MORA, R. F.; DALIA, R. A.; MOURA, L. P.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 116, 2010.
4. CAMACHO, T. C.; ROBERTS, R. E.; LAZARUS, N. B.; KAPLAN, G. A.; COHEN, R. D. Physical Activity and Depression: Evidence from the Alameda County Study. **Am J Epidemiol**, v. 134, p. 220–31, 1991.
5. CAMBRI, L. T.; ARAUJO, G. G.; GHEZZI, A. C.; BOTEZELLI, J. D.; MELLO, M. A. R. Metabolic responses to acute physical exercise in young rats recovered from fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 164, 2011.
6. CAMBRI, L. T.; DALIA, R. A.; RIBEIRO, C.; MELLO, M. A. R. Aerobic capacity of rats recovered from fetal malnutrition with a fructose-rich diet. **Appl Physiol Nut Metab**, v. 35, p. 490-497, 2010.
7. CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; RIBEIRO, C.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Nutr Res**, v. 30, p. 156–162, 2010.
8. CARPENTER, K. C.; STROHACKER, K.; BRESLIN, W. L.; LOWDER, T. W.; AGHA, N. H.; MCFARLIN, B. K. Effects of exercise on weight loss and monocytes in obese mice. **Comp Med**, v. 62, p. 21-6, 2012.
9. CINTI, S. The adipose organ. **Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids**, v. 73, p. 9–5, 2005.

10. CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. Physical exercise and metabolic syndrome. **Rev Bras Med Esporte**, v. 4, p. 319-324, 2004.
11. CUNHA, R. R.; CUNHA, V. N. C.; SEGUNDO, P. R.; MOREIRA, S. R.; KOKUBUN, E.; CAMPBELL, C. S. G.; OLIVEIRA, R. J.; SIMÕES, H. G. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochem Funct**, v. 27, p. 351–357, 2009.
12. DE SOUZA, C. A.; SHAPIRO, L. F.; CLEVINGER, C. M.; DINENNO, F. A.; MONAHAN, K. D.; TANAKA, H.; SEALS, D. R. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation**, v. 102, p. 1351-1357, 2000.
13. EDMA, Associação Européia de Fabricantes de Meios de Diagnóstico, 2007: <http://www.apifarma.pt/areas/div/Documents/Diabetes.pdf>
14. EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O.; MELLO, M. T.; TUFIK, S.; DAMASO, A. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Rev Bras Med Esp**, v. 14, p. 182-187, 2008.
15. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; BOTEZELLI, J. D.; RIBEIRO, C.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Metabolic syndrome in rats at different ages. **Diabetol Metab Syndr**, v. 4, p. 1-7, 2012.
16. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; RIBEIRO, C.; BOTEZELLI, J. D.; MELLO, M. A. R. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 3, 2011
17. GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; DE AZEVEDO, J. R.; DOS SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem and Physiol**, v. 130, p. 21-27, 2001.
18. GUEDES, D. P.; GONÇALVES, L. A. V. V. Impacto da prática habitual de atividade física no perfil lipídico de adultos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, p. 72-78, 2007.
19. HAVEMAN-NIES, S.; DE GROOT, L. C. P. G. M.; STAVEREN, W. A. V. Dietary quality, lifestyle factors and healthy aging in Europe: the SENECA study. **Age and Aging**, v. 32, p. 427–434, 2003.

20. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int J Sports Med**, v. 6, p. 117-130, 1985.
21. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios [Profile of elderly heads of households]. 2002. Available _____ at: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>. Accessed on: 15 Jun. 2011.
22. KARTZEL, L. I.; BLEECKER, E. R.; COLMAN, E. G.; ROGUS, E. M.; SORKIN, J. D.; GOLDBERG, A. P. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary artery disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA**, v. 274, p. 1915-1921, 1995.
23. KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S.; TRAN, Z. V. Exercise, lipids, and lipoproteins in older adults: a meta-analysis. **Prev Cardiol**, v. 8, p. 206-214, 2005.
24. MATTERN, C. O.; GUTILLA, M. J.; BRIGHT, D. L.; KIRBY, T. E.; HINCHCLIFF, K. W.; DEVOR, S. T. Maximal lactate steady state declines during the aging process. **Journ Appl Physiol**, v. 95, p. 2576-2582, 2003.
25. MILLER, G. D.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C. C.; LEGAULT, C.; MESSIER, S. P. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. **J Nutr Health Aging**, v. 16, p. 169-74, 2012.
26. PELLIZZON, M.; BUISON, A.; ORDIZ, F. J.; SANTA ANA, L.; JEN, C. Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats. **Obes Res**, v. 10, p. 947-955, 2002
27. POLLOCK, M. L.; DAWSON, G. A. Physiologic responses of men 49 to 65 years of age to endurance training. **J Am Geriatr Soc**, v. 24, p. 97-104, 1976.
28. TAKESHIMA, N.; KOBAYASHI, F.; WATANABE, T.; TANAKA, K.; TOMITA, M.; POLLOCK, M. L. Cardiorespiratory responses to cycling exercise in trained and untrained healthy elderly: with special reference to the lactate threshold. **Diabetes Metab**, v. 16, p. 290-5, 1990.
29. TWISK, J. W. R.; KEMPER, H. C. G.; VAN MECHELEN, W. The relationship between physical fitness and physical activity during adolescence and cardiovascular disease risk factors at adult age. The Amsterdam growth and health longitudinal study. **Int J Sports Med**, v. 23, p. 8-14, 2002.

30. VARADAY, K. A.; EBINC, N.; VANSTONE, C. A. Plant sterols and endurance training combine to favorably alter plasma lipid profiles in previously sedentary hypercholesterolemic adults after 8 wk. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1159-66, 2004.
31. WAREHAM, N. J.; WONG, M. Y.; HENNINGS, S.; MITCHELL, J.; RENNIE, K.; CRUICKSHANK, K.; DAY, N. E. Qualitifying association between habitual energy expenditure and blood pressure. **Int J Epidemiol**, v. 29, p. 655-660, 2000.

4.3 CAPÍTULO 3:

CAPACIDADE AERÓBIA E METABOLISMO MUSCULAR DA GLICOSE EM RATOS IDOSOS TREINADOS NA MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO

Resumo

As doenças metabólicas que estão associadas com a obesidade, como hipertensão, dislipidemias e diabetes tipo 2 são responsáveis pela morte de 2,6 milhões de pessoas a cada ano e as projeções indicam que esses números crescerão, apesar das políticas públicas adotadas. Diante desse quadro mundial de pandemia de doenças metabólicas o exercício físico tem sido utilizado como tratamento não medicamentoso para diversas patologias, como diabetes mellitus, hipertensão, obesidade, alterações nos lipídios plasmáticos e resistência à insulina. Apartir disso, é interessante verificar o efeito do exercício físico sistematizado e submáximo no metabolismo da glicose muscular em ratos Wistar com 12 meses. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus com 1 ano de idade. O estudo foi composto por 3 grupos: Controle (n=8) – não submetidos ao treinamento físico; Treinado (n=8) – submetidos ao treinamento físico na intensidade de 80% da máxima fase estável de lactato (dos 4 até 12 meses); Destreinado (n=8) – submetidos ao treinamento físico na intensidade de 80% da MFEL (dos 4 até 8 meses e avaliados aos doze meses).

Ao final do experimento foi registrado o peso corporal, foi realizado teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina, assim como dosagem de glicose, o tecido adiposo, das regiões mesentérica, retroperitonal e subcutânea posterior, foi removido para determinação da concentração dos lipídios totais, foi determinada a concentração de glicogênio do coração, fígado e músculo sóleo e a captação de glicose pelo músculo sóleo. O treinamento físico em intensidades submáximas provocou importantes adaptações, como diminuição do peso corporal e da concentração de lipídios totais da região mesentérica, aumento da carga de exercício físico na intensidade de máxima fase estável de lactato, da tolerância a glicose, dos depósitos de glicogênio muscular e da captação de glicose pelo músculo esquelético de animais treinados. O exercício físico com características submáximas são mais atraentes e de mais fácil adesão, seja para população saudável, seja para a população que apresenta algum tipo de distúrbio metabólico, como a Síndrome Metabólica.

Palavras Chaves: Metabolismo de glicose, treinamento, destreinamento, peso corporal.

Introdução

As doenças metabólicas que estão associadas com a obesidade, como hipertensão, dislipidemias e diabetes tipo 2 são responsáveis pela morte de 2,6 milhões de pessoas a cada ano e as projeções indicam que esses números crescerão, apesar das políticas públicas adotadas (WHO, 2010).

A prevalência da Síndrome Metabólica tem aumentado cada vez mais (FORD, et al., 2002). Os fatores que compõe a Síndrome Metabólica são fortes fatores de risco para doenças cardiovasculares, que por sua vez é a patologia que mais assola a população, causando grande número de mortos (DUNCAN & SCHIMIDT, 2001).

A definição mais atual para a Síndrome Metabólica é da Federação Internacional de Diabetes (2005), e os parâmetros considerados são obesidade central e mais dois dos seguintes fatores de risco, diabetes ou pré-diabetes, baixo nível de HDL-C, triglicerídeos elevados e hipertensão.

Já é evidenciado que a Síndrome Metabólica tem um componente genético, porém não se sabe certamente sua etiologia. Estudos recentes tem sugerido que a obesidade desencadeia um baixo grau de inflamação sistêmica ou inflamação subclínica que faz com que organismo desenvolva a resistência à ação da insulina e a partir daí outros distúrbios vão se acumulando dando origem a Síndrome Metabólica (WEISBERG et al., 2003; XU et. al., 2003).

O risco para a Síndrome Metabólica aumenta com o envelhecimento (GHEZZI et al., 2012) e sabendo-se que a expectativa de vida da população mundial tem crescido, é de grande interesse que estudos sejam realizados sobre essa complexa síndrome e as possíveis abordagens para seu tratamento em indivíduos idosos.

Diante desse quadro mundial de pandemia de doenças metabólicas o exercício físico tem sido utilizado como tratamento não medicamentoso para diversas patologias, como diabetes mellitus, hipertensão, obesidade, alterações nos lipídios plasmáticos e resistência à insulina (CARPENTER KC et al., 2012; MILLER et al., 2012, KARTZEL et al., 1995, DE SOUZA et al., 2000, CAMACHO et al. 1991; BOTEZELLI et al. 2010 ; BOTEZELLI et al., 2011; BOTEZELLI et al., 2012).

O exercício físico realizado de maneira controlada (volume, frequência e intensidade) traz diversos benefícios para o organismo, seja no controle de doenças, ou na melhora da capacidade aeróbia (BOTEZELLI et al., 2011; ISSURIN, et al., 2008). A melhora do condicionamento físico é esperada quando há um programa de treinamento físico sistematizado (ARAUJO et al., 2012).

A capacidade aeróbia, também conhecida como $\text{VO}_2 \text{ máx}$, nada mais é do que à quantidade máxima de oxigênio que o corpo consegue captar, transportar e utilizar em uma sessão de exercício físico afim de gerar energia (HAYES et al., 1990).

Com exercícios físicos regulares é possível melhorar a capacidade aeróbia ao longo do tempo, e também observar um declínio desta capacidade em resposta a uma variedade de fatores, incluindo declínio da atividade física, doenças crônicas e envelhecimento (CARMELI et al., 2003; HEATH et al., 1981). Para atletas, a capacidade aeróbia é um aspecto importante para elaboração dos treinamentos e para avaliação das melhoras na aptidão.

É preconizado que o exercício físico deve ser praticado de maneira crônica e de forma controlada para que as adaptações geradas na capacidade aeróbia persistam. O treinamento físico realizado com uma intensidade conhecida e prescrita de acordo com a capacidade física do indivíduo oferece maior segurança na realização de exercícios físicos. Para isto, o teste de máxima fase estável de lactato (MFEL), que é considerado padrão ouro para determinar a transição da predominância aeróbia/anaeróbia em exercício físico com carga constante, é frequentemente utilizado (HECK et al., 1985)

Outra adaptação importante que o treinamento físico provoca é o aumento do glicogênio muscular (ARAUJO et al., 2012; GHANBARI-NIAKI et al., 2011; BERGSTROM et al., 1967). O glicogênio muscular é uma importante fonte de substrato para gerar energia durante o exercício físico, portanto com o incremento deste parâmetro, o indivíduo terá substratos para gerar energia por um tempo maior, o que pode ser determinante na duração do exercício físico de caráter aeróbio (BERGSTROM et al., 1967).

O glicogênio muscular só pode ser utilizado pela própria musculatura, porém o fígado, que possui uma maior concentração de glicogênio, pode liberar glicose na corrente sanguínea pela glicogenólise, um importante mecanismo para a homeostase glicêmica (CONSOLI et al., 1992).

O aumento da captação de glicose pela musculatura esquelética é importante para a melhora da glicemia, sejam em indivíduos diabéticos ou normoglicêmicos e o exercício físico comprovadamente é responsável pelo incremento na captação de glicose pela musculatura voluntária (LUCIANO et al., 2002).

Diante disso, é interessante verificar o efeito do exercício físico sistematizado e submáximo no metabolismo da glicose muscular em ratos Wistar idosos.

Materias e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, variação albinus. O experimento foi iniciado com os animais aos 2 meses de idade, os quais foram mantidos até os 12 meses. Os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina), água ad libitum e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (4 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro. Todos os procedimentos adotados com os animais foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (CEUA), sob o protocolo 2638.

Delineamento e Grupos Experimentais

De acordo com o treinamento físico recebido, os ratos foram separados em três grupos:

Grupo Controle (n=8) – não submetidos ao treinamento físico e avaliados aos doze meses;

Grupo Treinado (n=8) – submetidos ao treinamento físico na intensidade de 80% da MFEL, iniciado na idade adulta jovem (quatro meses de idade), mantidos até o final do estudo (doze meses de idade) e avaliados aos doze meses;

Grupo Destreinado (n=8) – submetidos ao treinamento físico na intensidade de 80% da MFEL iniciado na idade adulta jovem (quatro meses de idade), com duração de quatro meses (interrompido aos oito meses de idade) e avaliados aos doze meses.

Treinamento Físico

Os animais dos grupos treinados e destreinados foram submetidos ao exercício de natação, em tanques individuais, contendo água a 30 ± 2 graus, 1 hora por dia, 5 dias por semana, suportando sobrecargas de chumbo atadas ao tórax, 80% da carga equivalente a zonas da transição da predominância metabólica aeróbia/anaeróbia individual, identificada pela máxima fase estável de lactato. A máxima fase estável de lactato foi avaliada, a cada dois meses para reajuste das cargas de treinamento.

Máxima Fase Estável de Lactato - MFEL

A identificação das zonas de transição da predominância metabólica durante exercício de natação e a avaliação da capacidade aeróbia dos animais foram efetuadas pelo protocolo de máxima fase estável de lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios físicos com cargas constantes (HECK et al., 1985) e sua determinação tem se mostrado útil na prescrição de exercícios físicos e na avaliação da capacidade aeróbia. No presente estudo utilizou-se um protocolo para a determinação da MFEL em ratos durante exercício de natação (GOBATTO et al., 2001), descrito por nosso grupo de pesquisa.

Os animais foram submetidos a vários testes de natação, suportando sobrecargas constantes e crescentes em relação ao peso corporal, com intervalos de 48 horas entre eles, até que não foi mais possível a estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício físico. Cada teste consistiu de 25 minutos de natação contínua suportando uma carga, com coleta de sangue, por pequeno corte na extremidade da cauda a cada 5 minutos para a determinação das concentrações de lactato. As concentrações de lactato sanguíneo foram determinadas em analisador de lactato (modelo YSI 1500 Sport, YellowSprings, OH, EUA). O critério de estabilização empregado foi diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 25 minutos de exercício.

Peso corporal

O peso corporal foi registrado ao final do experimento em balança digital.

Teste de tolerância à glicose – GTT

A tolerância à glicose dos animais foi avaliada pelo GTT. Este foi realizado com os animais na última semana do experimento, após 12 horas de jejum, quando uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 20% (2 g/Kg de peso) foi administrada aos ratos por meio de sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25µL, visando a determinação das concentrações glicose e insulina. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método glicose-oxidase. Os resultados foram analisados pela determinação

das áreas sob as curvas de glicose sérica durante o teste pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando-se o software ORIGIN.

Teste de Tolerância à insulina - ITT

A sensibilidade periférica à insulina foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT). Este foi realizado com os animais 48 horas após o GTT, quando uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de insulina cristalina (LILLY U 40) na dose de 30 μ UI/100g de peso foi administrada via subcutânea. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 μ L, visando à determinação das concentrações de glicose, pelo método da glicose-oxidase. Um único corte na extremidade da cauda foi suficiente para a coleta de todas as amostras sanguíneas. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $0,0693/(t/2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose no sangue de nos momentos após a administração de insulina em que a glicose sérica decair (LUNDBAECK, 1962) empregando-se o software ORIGIN.

Sacrifício dos animais e obtenção de material biológico

Ao final do experimento, ao atingirem 12 meses, os animais foram mortos em repouso e em estado alimentado por decapitação, após anestesia profunda com CO₂, 48 horas depois da última avaliação "in vivo". Amostras de sangue foram coletadas para a separação do soro e dosagem de glicose, utilizando kits comerciais (LABORLAB[®]).

Tecido adiposo

O tecido adiposo, das regiões mesentérica, retroperitonal e subcutânea posterior, foi removido para determinação da concentração de lipídios totais (NOGUEIRA et al., 1990). A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005).

Fígado e coração e músculo esquelético sóleo

Alíquotas do coração, fígado e músculo sóleo foram extirpadas visando a determinação das concentrações de glicogênio, pelo método de Dubois et al., (1956).

Músculo esquelético sóleo

Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato, enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) [2-DG] e insulina (100 mU/mL), dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e gaseamento contínuo com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante, em banho-maria (37°C). Foi avaliada a captação de glicose, utilizando-se a 2-DG como marcador e medindo-se a radioatividade do [^3H] com auxílio de contador de partículas beta (NUNES et al., 2005).

Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA one-way), com nível de significância pré-estabelecido em 5%. Quando necessário, foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls.

Resultados

A Tabela 1 mostra os valores de glicemia e da área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância a glicose (GTT). Foi evidenciado que os animais controles possuem maior área sob a curva de glicose que os outros grupos. Assim como, os animais destreinados apresentam uma tendência a ter maior área em relação aos treinados.

Tabela 1: Média e desvio padrão dos valores de glicemia (mg/dL) e da área sob a curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose (MG/dL.120min) – GTT.

Grupos	T0	T30	T60	T120	Área sob curva
Controle	82±6 ^a	99±12 ^a	117±8 ^a	95±12 ^a	12314±1122 ^a
Treinado	53±6 ^b	71±7 ^b	77±9 ^b	75±6 ^b	8428±853 ^b
Destreinado	62±10 ^b	79±10 ^b	82±16 ^b	82±10 ^b	9433±1200 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

A Tabela 2 mostra os valores de glicemia e a constante de remoção de glicose (KITT) durante o teste de tolerância à insulina - ITT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de glicemia(mg/dL) e constante de remoção de glicose - KITT durante o teste de tolerância à insulina – ITT(%)

Grupos	T0	T30	T60	T120	KITT
Controle	103±6	85±8	90±11	119±16	0,66±0,18
Treinado	102±6	89±10	89±10	92±13	0,62±0,24
Destreinado	110±7	99±10	91±23	104±26	0,56±0,26

Nota: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way $p < 0,05$).

Os valores da carga relativa ao peso corporal (%) referentes à máxima fase estável de lactato foram: Controle = $4,6 \pm 0,4^b$, Treinado = $5,8 \pm 1,3^a$, Destreinado = $5,3 \pm 0,4^a$, portanto os animais controle possuem menor carga relativa ao peso corporal (%) na máxima fase estável de lactato do que os animais Treinados e Destreinados.

Na tabela 3, observa-se os valores de peso corporal e da concentração de lipídios totais do tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal e subcutâneo posterior. Foi evidenciada diferença significativa para peso corporal e da concentração de lipídios no tecido mesentérico, sendo que os animais treinados possuem menores valores para estas variáveis.

Tabela 3: Média e desvio padrão do peso corporal (g) e da concentração de lipídios totais (mg/100 mg) mesentérico, retroperitoneal, subcutâneo dos animais ao final do experimento.

Grupos	Peso corporal	Mesentérica	Retroperitoneal	Subcutânea
Controle	588±71 ^a	4399±643 ^a	3191±703	1896±758
Treinado	515±72 ^b	3007±811 ^b	2604±1112	1635±188
Destreinado	576±62 ^a	4085±540 ^a	3600±858	1897±385

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Não foi encontrada diferença significativa (tabela 4) para os valores de glicose sérica do momento do sacrifício, apesar do grupo treinado apresentar menores valores. Contudo, quanto à concentração de glicogênio do músculo sóleo, hepático e cardíaco (tabela 4), observou-se diferença estatisticamente significativa somente para os valores de glicogênio muscular, sendo que, os animais treinados possuem uma maior concentração desse substrato do que os animais sedentários e destreinados. Na tabela 4 são apresentados os valores de captação de glicose pelo músculo sóleo isolado, na qual, os grupos treinados e destreinados apresentam maiores valores em relação ao controle.

Tabela 4: Média e desvio padrão da glicose sérica (mg/dl), glicogênio (mg/100mg) do cardíaco, hepático e muscular, e captação de glicose pelo músculo sóleo isolado ($\mu\text{mol/g.h}$).

Grupos	Glicose Sérica	Glicogênio Cardíaco	Glicogênio hepático	Glicogênio muscular	Captação Glicose
Controle	157±26	0,06±0,01	6,04±0,68	0,48±0,07 ^b	1,96±0,54 ^b
Treinado	140±24	0,06±0,01	6,12±0,35	0,66±0,18 ^a	3,28±0,53 ^a
Destreinado	154±17	0,07±0,01	6,16±1,00	0,46±0,10 ^b	2,55±0,35 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way e post-hoc de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Discussão

O exercício físico realizado de maneira sistematizada (frequência, volume e intensidade) traz diversos benefícios para o organismo, seja no controle de doenças, ou na melhora da capacidade aeróbia. A melhora do condicionamento físico é esperada quando há um programa de treinamento físico sistematizado (ARAUJO et al., 2012).

Nossos resultados evidenciaram que o exercício físico reduziu a área sob a curva de glicose nos animais treinados, importante adaptação, pois quanto menor o valor da curva glicêmica durante o GTT, melhor o organismo responde frente à exposição à glicose (hiperglicemia) e é mais eficiente em absorver o substrato da corrente sanguínea. Deste modo, o exercício físico atua prevenindo a intolerância à glicose, o que é de grande importância, pois indivíduos intolerantes à glicose possuem um risco de 11%/ano maior de desenvolver diabetes tipo 2 do que indivíduos normais (KNOWLER et al., 2002). Alguns estudos atestam também, que o exercício físico diminui a intolerância à glicose (CASTANEDA et al 2002; MOTTA et al., 2008; FIDALGO et al., 2012).

Quanto ao ITT, pode-se constatar que a sensibilidade à ação da insulina não foi alterada em nenhum grupo, podemos fazer a ressalva que o ITT não é o padrão ouro para determinar a sensibilidade à insulina, talvez se tivéssemos realizado o ITT de tempo curto pudessemos observar melhor os pontos e encontrar a diferença entre os grupos ou então se utilizássemos testes mais diretos.

Já para a carga de trabalho na máxima fase estável de lactato, pôde-se verificar, como esperado, que os animais controle possuem uma carga menor quando comparados aos treinados e destreinados, corroborando a literatura (FERREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2012). É interessante observar que os animais do grupo destreinado ainda possuem uma carga de trabalho relativa à MFEL maior do que os sedentários, mas já com uma tendência de redução, portanto, a adaptação à esse parâmetro perdurou até o fim do experimento, essa manutenção pode ser devido a intensidade na qual o exercício era realizado e também ao fato de que a carga era ajustada de 2 em 2 meses.

Houve diminuição do peso corporal no grupo Treinado, assim como, diminuição da concentração de lipídios totais do tecido adiposo da região mesentérica dos animais treinados, corroborando com a literatura (SANAL et al., 2012, CARPENTER et al., 2012; MILLER et al., 2012). O aporte de gordura da região mesentérica está intimamente ligado à resistência à ação da insulina, assim como, outros agravos metabólicos (LERARIO et al., 2002). Por outro lado, os animais do grupo Destreinado obtiveram peso corporal semelhante ao grupo Controle, possivelmente por esses animais terem sido mantidos por 4 meses de inatividade

física, e com isto, o gasto calórico diminuiu em relação ao grupo treinado. A partir disso, pode-se observar que o exercício físico deve ser mantido durante toda a vida do indivíduo para que as adaptações metabólicas perdurem, como exemplo, o aumento do metabolismo basal. Lo et al., (2011) demonstraram que indivíduos treinados aerobicamente e posteriormente, mantidos em 24 semanas de destreinamento, perderam as adaptações alcançadas com o treinamento, com aumento de peso corporal e diminuição do $VO_{2máx}$. Outros estudos (VOGLER et al., 2012; MITSUHASHI et al., 2011; ORMSBEE et al., 2011) sustentam que o destreinamento não provoca só perda na capacidade aeróbia, mas altera também a composição corporal. Isso pode ser observado tanto em atletas, quanto em adultos saudáveis ou com algum tipo de restrição.

Já a concentração de glicose sérica não foi modificada pelo treinamento físico. O estudo de Geirsdottir et al. (2012), com indivíduos idosos, apontou que o exercício físico não melhora a glicemia de indivíduos normoglicêmicos, mas por outro lado é eficiente em diminuir a glicemia de idosos pré-diabéticos.

No presente estudo, pode-se constatar também que o exercício físico foi eficiente em aumentar os depósitos de glicogênio muscular nos animais treinados, porém possivelmente os animais destreinados, por terem passado por um período relativamente longo de destreinamento, já não possuíam essa diferença quando comparado com os animais sedentários, ao final do experimento. Isto confirma os achados de Pauli et al. (2005) que também observaram aumento do glicogênio muscular quando os animais foram submetidos ao treinamento físico por 10 semanas, do mesmo modo, como outros estudos da literatura (ARAUJO et al., 2012; GHANBARI-NIAKI et al., 2011). As reservas de glicogênio muscular são importantes na realização de exercício físico prolongado pois é através desse substrato que é gerada a energia necessária para a contração muscular (BERGSTROM et al., 1967).

Por outro lado, o treinamento físico não causou alterações nos depósitos de glicogênio hepático e cardíaco, portanto vale ressaltar que, os transportadores de glicose - os GLUTS - dos hepatócitos (GLUT-2) e células musculares (GLUT-4), assim como, do coração (GLUT-4) são distintos e com isto, as adaptações ao exercício físico possivelmente são diferentes.

Sendo a glicose, importante substrato para a realização do trabalho muscular, é de interesse discutir o seu metabolismo muscular entre animais treinados, destreinados e sedentários. Para isso, avaliou-se a captação de glicose no músculo sóleo incubado e verificou-se que os animais Treinados e Destreinados possuem maior captação de glicose do que os animais Controle, demonstrando que o exercício físico tem efeito benéfico sobre a captação de glicose (LUCIANO et al., 2002). Estudos ainda demonstram que exercício físico,

mesmo de maneira aguda, é capaz de aumentar a fosforilação do receptor de insulina e assim, melhorar a captação de glicose em animais idosos (PAULI et al., 2010).

A capacidade aeróbia parece ter maior influência na tolerância à glicose e captação, pois o Grupo Destreinado mantece uma elevada capacidade aeróbia e por consequência maior tolerância à glicose e captação de glicose. Ao contrário da concentração de lipídios e do peso corporal que são dependentes do gasto energético diário.

O exercício físico com características submáximas são mais atraentes e de mais fácil adesão, seja para população saudável, seja para a população que apresenta algum tipo de distúrbio metabólico, como a Síndrome Metabólica

Por fim, pode-se concluir que o treinamento físico em intensidades submáximas (80% da MFEL) provocou importantes adaptações, como diminuição do peso corporal e da concentração dos lipídios totais da região mesentérica, aumento da carga de exercício físico na intensidade de máxima fase estável de lactato, da tolerância à glicose, dos depósitos de glicogênio muscular e da captação de glicose pelo músculo esquelético de animais treinados.

Podemos dizer também que a intensidade do exercício a 80% da MFEL foi importante tanto para provocar as adaptações nos animais treinados como foi importante para que os animais destreinados não perdessem essas alterações após o período de destreinamento, portanto a intensidade do exercício é extremamente importante para que o exercício físico tenha o efeito benéfico sobre a saúde.

Referências

1. ARAUJO, G. G.; PAPOTI, M.; DOS REIS, I. G.; DE MELLO, M. A.; GOBATTO, C. A. Physiological responses during linear periodized training in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, p. 839-52, 2012.
2. BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiol Scand**, v. 2, p. 140-50, 1967.
3. BOTEZELLI, J. D.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; DALIA, R. A.; SCARIOT, P. P. M.; RIBEIRO, C.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, p. 35, 2011.
4. BOTEZELLI, J. D.; MOURA, R. F.; DALIA, R. A.; MOURA, L.P.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; MELLO, M. A. R. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 116, 2010.
5. CAMACHO, T. C.; ROBERTS, R. E.; LAZARUS, N. B.; KAPLAN, G. A.; COHEN, R. D. Physical Activity and Depression: Evidence from the Alameda County Study. **Am J Epidemiol**, v. 134, p. 220–31, 1991.
6. CARMELI, E.; ORBACH, P.; LOWENTHAL, D. T.; MERRICK, J.; COLEMAN, R. Long-term effects of activity status in the elderly on cardiorespiratory capacity, blood pressure, blood lipids, and body composition: a five-year follow-up study. **Scientific World J**, v. 3, p. 751-67, 2003.
7. CARPENTER, K. C.; STROHACKER, K.; BRESLIN, W. L.; LOWDER, T. W.; AGHA NH, MCFARLIN BK. Effects of exercise on weight loss and monocytes in obese mice. **Comp Med**, v. 62, p. 21-6, 2012.
8. CASTANEDA, C.; LAYNE, L. E; ORIAN, L. M.; GORDON, P. L.; WALSMITH, J.; FOLDVARI, M. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 2335-41, 2002.
9. CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, p. 9–15, 2005.
10. CONSOLI, A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. **Diabetes Care**, v. 3, p. 430-41, 1992.
11. DE SOUZA, C. A.; SHAPIRO, L. F.; CLEVINGER, C. M.; DINENNO, F. A.; MONAHAN, K. D.; TANAKA, H.; SEALS, D. R. Regular aerobic exercise prevents

- and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation**, v. 102, p.1351-1357, 2000.
12. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v. 28, p. 350-6, 1956.
 13. DUNCAN, B. B.; SCHIMIDT, M. A. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. **Sao Paulo Med J**, v. 119, p. 122–127, 2001.
 14. FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 1º Congresso Internacional de Pré-Diabetes e Síndrome Metabólica. Berlim: 2005.
 15. FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 8, p. 760-5, 2007.
 16. FIDALGO, M.; FALCÃO, T. F.; BENTO, S. A.; DE OLIVEIRA, E.; NOGUEIRA, J. F.; DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; DE CASTRO, R. M.; LEANDRO, C. G. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 1, p.1-8, 2012.
 17. FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, v. 287, p. 356–359, 2002.
 18. GEIRSDOTTIR, O. G.; ARNARSON, A.; BRIEM, K.; RAMEL, A.; JONSSON, P. V.; THORSDDOTTIR, I. Effect of 12-Week Resistance Exercise Program on Body Composition, Muscle Strength, Physical Function, and Glucose Metabolism in Healthy, Insulin-Resistant, and Diabetic Elderly Icelanders. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 11, p. 1259-65. 2012.
 19. GHANBARI-NIAKI, A.; KRAEMER, R. R.; ABEDNAZARI, H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. **Horm Metab Res**, v. 2, p.112-6, 2011
 20. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; BOTEZELLI, J. D.; RIBEIRO, R.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. **Diabetol Metab Syndr**, v. 4, p. 1-7, 2012.

21. GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; DE AZEVEDO, J. R.; DOS SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem and Physiol**, v. 130, p. 21-27, 2001.
22. HAYES, J. P.; CHAPPELL, M. A. Individual consistency of maximal oxygen consumption in deer mice. **Funct. Ecol**, v. 4, p. 495-503, 1990.
23. HEATH, G.W.; HAGBERG, J. M.; EHSANI, A. A.; HOLLOSZY, J. O. A physiological comparison of young and older endurance athletes. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 51, p. 634–640, 1981.
24. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold, **Int J Sports Med**, v. 6, p. 117-130, 1985.
25. ISSURIN, V. B. Block periodization versus traditional training theory: a review. **J Sports Med Phys Fit**, v. 48, p. 65–75, 2008.
26. KARTZEL, L. I.; BLEECKER, E. R.; COLMAN, E. G.; ROGUS, E. M.; SORKIN, J. D.; GOLDBERG, A. P. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary artery disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA**, v. 274, p. 1915-1921, 1995.
27. KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; LACHIN, J. M.; WALKER, E. A. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v. 346, p. 393-403, 2002.
28. LERARIO, D. D. G.; GIMENO, S. G.; FRANCO, L. J.; IUNES, M.; FERREIRA, S. R. G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, 2002: doi: 10.1590/S0034-89102002000100002
29. LO, M. S.; LIN, L. L.; YAO, W. J.; MA, M. C. Training and detraining effects of the resistance vs. endurance program on body composition, body size, and physical performance in young men. **J Strength Cond Res**, v. 8, p. 2246-54, 2011.
30. LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R.; CARVALHEIRA, J. B.; PERES, S. B.; REIS, M. A.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; VELLOSO, L. A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**, v. 147, p. 149-157, 2002.
31. LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R.; CARVALHEIRA, J. B.; PERES, S. B.; REIS, M. A.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; VELLOSO, L. A.

- Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**, v.147, p.149-157, 2002.
32. LUNDBAECK, K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v. 2, p. 1507-1513, 1962.
 33. MATHEWS, J. N. S.; ALTAMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br Med J**, v. 27, p. 230-5, 1990.
 34. MILLER, G. D.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C. C.; LEGAULT, C.; MESSIER, S. P. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. **J Nutr Health Aging**, v. 16, p. 169-74, 2012.
 35. MITSUHASHI, T.; YAMADA, C.; IIDA, A.; HIRATSUKA, N.; INABE, F.; ARAIDA, N.; MORIYAMA, K.; SASAMORI, H.; SASAMORI, N.; MIYACHI, M.; TAKAHASHI, E. Long-term detraining increases the risk of metabolic syndrome in Japanese men. **Tokai J Exp Clin Med**, v.4, p. 95-9, 2011.
 36. MOTTA, C. S. A.; RIBEIRO, C.; DE ARAÚJO, G. G.; DE ARAÚJO, M. B.; DE BARROS, M. G. F.; VOLTARELLI, F. A.; DE OLIVEIRA, C. A.; LUCIANO, E.; DE MELLO, M. A. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. **BMC Endocr Disord**, v. 8, p. 11, 2008.
 37. ORMSBEE, M. J.; ARCIERO, P. J. Detraining Increases Body Fat and Weight and Decreases VO₂peak and Metabolic Rate. **J Strength Cond Res**, v. 8, p. 2087-95, 2011
 38. PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; DE ALMEIDA, J. A. L.; LUCIANO, E.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 5, p. 323-9, 2010.
 39. PAULI, R. J.; LEME, J.; CRESPILO, D.; MELLO, M. A. R.; ROGATTO, G.; LUCIANO, E. Influencia do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo pituitária adrenal de ratos administraos com dexametasona. **Rev. Port. Cien. Desp**, v.5, 2005.

40. SANAL, E.; ARDIC, F.; KIRAC, S. Effects of aerobic or combined aerobic resistance exercise on body composition in overweight and obese adults: gender differences. a randomized intervention study. **Eur J Phys Rehabil Med**, 2012.
41. SANTOS, A. P.; MARINHO, D. A.; COSTA, A. M.; IZQUIERDO, M.; MARQUES, M. C. The effects of concurrent resistance and endurance training follow a detraining period in elementary school students. **J Strength Cond Res**, v. 6, p. 1708-16, 2012.
42. VOGLER, C. M.; MENANT, J. C.; SHERRINGTON, C.; OGLE, S. J.; LORD, S. R. Evidence of Detraining After 12-Week Home-Based Exercise Programs Designed to Reduce Fall-Risk Factors in Older People Recently Discharged From Hospital. **Arch Phys Med Rehabil**, 2012.
43. WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JR AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1796–1808, 2003.
44. World Health Organization (WHO): 10 facts on obesity, fev. 2010 [Acesso em: 27 de fev. 2010]. Disponível em <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>.
45. XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1821–1830, 2003.

5. CONCLUSÕES GERAIS:

A partir dos dados apresentados na presente dissertação, pode-se constatar que:

O envelhecimento originou características da Síndrome Metabólica. Os animais apresentaram, na maturidade, aumento significativo de peso corporal e do conteúdo de lipídios no tecido adiposo, bem como, dislipidemia, com elevação na concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e LDL colesterol. Do mesmo modo, tiveram aumento da glicose sérica quando comparados aos grupos mais jovens. Assim sendo, ratos Wistar em processo de envelhecimento parecem um modelo interessante para o estudo das alterações desencadeadas pela síndrome metabólica.

O envelhecimento ocasionou declínio na capacidade aeróbia de animais sedentários, porém o exercício físico diminuiu os efeitos deletérios da idade e ainda previniu a obesidade, o que é de grande interesse, pois a capacidade aeróbia tem sido relacionada com uma vida saudável. Quanto maior a aptidão cardiorrespiratória menor a incidência de doenças metabólicas, como a obesidade e agravos de doenças cardiovasculares.

Por fim, o treinamento físico em intensidades submáximas (80% da MFEL) provocou importantes adaptações, como diminuição do peso corporal e da concentração de lipídios totais do tecido adiposo da região mesentérica, aumento da carga de exercício na intensidade de máxima fase estável de lactato, da tolerância a glicose, dos depósitos de glicogênio muscular e da captação de glicose pelo músculo esquelético de animais treinados. Podemos dizer também que a intensidade do exercício a 80% da MFEL foi importante tanto para provocar as adaptações nos animais treinados como foi importante para que os animais destreinados não perdessem essas alterações após o período de destreinamento, portanto a intensidade do exercício é extremamente importante para que o exercício físico tenha o efeito benéfico sobre a saúde e também para que esses benefícios perdurem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. ADAMS, R. J.; APPLETON, S.; WILSON, D. H.; TAYLOR, A. W.; DAL GRANDE, E.; CHITLEBOROUGH, C.; GILL, T.; RUFFIN, R. Population comparison of two clinical approaches to the metabolic syndrome: implications of the new International Diabetes Federation consensus definition. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2777-9, 2005
2. AITMAN, T. J.; GLAZIER, A. M.; WALLACE, C. A.; COOPER, L. D.; NORSWORTHY, P. J.; WAHID, F. N.; AL-MAJALI, K. M.; TREMBLING, P. M.; MANN, C. J.; SHOULDERS, C. C.; GRAF, D.; ST LENZIN, E.; KURTZ, T. W.; KREN, V.; PRAVENEC, M.; IBRAHIMI, A.; ABUMRAD, N. A.; STANTON, L. W.; SCOTT, J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. **Nat Genet**, v. 21, p.61-62, 1999.
3. ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, p.1059-1062, 2005.
4. ARAUJO, G. G.; PAPOTI, M.; DOS REIS, I. G.; DE MELLO, M. A.; GOBATTO, C. A. Physiological responses during linear periodized training in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, p. 839-52, 2012.
5. BARNARD, R. J.; LAWANI, L. O.; MARTIN, D. A.; YOUNGREN, J. F.; SINGH, R.; SCHECK, S. H. Effects of maturation and aging on the skeletal muscle glucose transport system. **Am J Physiol**, v. 262, p. E619–E626, 1992
6. BARROS, A. L. B. L.; VIEIRA, F. S.; ASSIS, C. C.; ZEITOUN, S. S. Alterações do nível pressórico e fatores de risco em graduandos de enfermagem. **Acta Paul. Enferm.**, São Paulo, v. 22, P. 773-778 2009 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-210020090006000008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 Jun. 2010.
7. BARZILAI, N.; ROSSETTI, L. Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. **Am J Physiol**, v. 269, p. E591–E597, 1995.
8. BELIZZI, M. C.; DIETZ, W. H. Workshop on childhood obesity: summary of the discussion. **Am J Clin Nutr**, v. 70, p.S173-5, 1999.
9. BENSIMHON, D. R.; KRAUS, W. E.; DANAHEUE, M.P. Obesity and physical activity: a review. **Am Heart J**, v. 151, p. 598-603, 2006.

10. BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand*, v. 2, p. 140-50, 1967.
11. BLAIR, S. N.; BRODNEY, S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, p. S646-62, 1999.
12. BOIS-JOYEUX, B.; CHANEZ, M.; PERET, J. Age-dependent glycolysis and gluconeogenesis enzyme activities in starved-refed rats. **Diabetes Metab**, v.16, p. 504-512, 1990.
13. BOTEZELLI, J. D.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; DALIA, R. A.; SCARIOT, P. P. M.; RIBEIRO, C.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, p. 35, 2011.
14. BOTEZELLI, J. D.; MORA, R. F.; DALIA, R. A.; MOURA, L. P.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 116, 2010.
15. BOULE, N. G.; HADDAD, E.; KENNY, G. P.; WELLS, G. A.; SIGAL, R. J. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. **JAMA**, v. 286, p. 1218-27, 2001.
16. BRANCHE, G.C.; BATIS, J. M.; DOWDY, V. M.; FIELD, L. S.; FRANCIS, C. K. Improving compliance in an Inner-City hypertension patient population. **Am.J. Medic.** v. 91, p.37s-41s, 1991.
17. CAMACHO, T. C.; ROBERTS, R. E.; LAZARUS, N. B.; KAPLAN, G. A.; COHEN, R. D. Physical Activity and Depression: Evidence from the Alameda County Study. **Am J Epidemiol**, v. 134, p. 220–31, 1991.
18. CAMBRI, L. T.; ARAUJO, G. G.; GHEZZI, A. C.; BOTEZELLI, J. D.; MELLO, M. A. R. Metabolic responses to acute physical exercise in young rats recovered from fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 164, 2011.
19. CAMBRI, L. T.; DALIA, R. A.; RIBEIRO, C.; MELLO, M. A. R. Aerobic capacity of rats recovered from fetal malnutrition with a fructose-rich diet. **APNM**, v. 35, p. 490-497, 2010.
20. CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; RIBEIRO, C.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Nutr Res**, v. 30, p. 156–162, 2010.

21. CARMELI, E.; ORBACH, P.; LOWENTHAL, D. T.; MERRICK, J.; COLEMAN, R. Long-term effects of activity status in the elderly on cardiorespiratory capacity, blood pressure, blood lipids, and body composition: a five-year follow-up study. **Scientific World J**, v. 3, p. 751-67, 2003.
22. CARPENTER, K. C.; STROHACKER, K.; BRESLIN, W. L.; LOWDER, T. W.; AGHA, N. H.; MCFARLIN, B. K. Effects of exercise on weight loss and monocytes in obese mice. **Comp Med**, v. 62, p. 21-6, 2012.
23. CARRASCOSA, J. M.; RUIZ, P.; MARTINEZ, C.; PULIDO, J. A.; SATRU, S. J.; ANDRES, A. Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 160, p. 303–309, 1989.
24. CARTEE, G. D.; BRIGGS-TUNG, C.; KIETZKE, E. W. Persistent effects of exercise on skeletal muscle glucose transport across the life-span of rats. **J Appl Physiol**, v. 75, p. 972–978, 1993.
25. CASTANEDA, C.; LAYNE, L. E.; ORIAN, L. M.; GORDON, P. L.; WALSMITH, J.; FOLDVARI, M. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 2335-41, 2002.
26. CHANDLER, C. E.; WILDER, D. E.; PETTINI, J. L.; SAVOY, Y. E.; PETRAS, S. F.; CHANG, G.; VINCENT, J.; HARWOOD, J. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. **J Reser**, v. 44, p. 1887-1901, 2003.
27. CINTI, S. The adipose organ . **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, p. 9–15, 2005.
28. CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. Physical exercise and metabolic syndrome. **Rev Bras Med Esporte**, v. 4, p. 319-324, 2004.
29. CONSOLI, A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. **Diabetes Care**, v. 3, p. 430-41, 1992.
30. COURTEN, M.; BENNETT, P. H.; TUOMILEHTO, J.; ZIMMET, P. Epidemiology of niddm in non-europids. **Inter Textbook Diabetes Mellitus**, v. 2, p 143-70, 1997.
31. COUTINHO, W. Consenso Latino-Americano de obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, p. 21-67, 1999.
32. CUNHA, R. R.; CUNHA, V. N. C.; SEGUNDO, P. R.; MOREIRA, S. R.; KOKUBUN, E.; CAMPBELL, C. S. G.; OLIVEIRA, R. J.; SIMÕES, H. G.

- Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochem Funct**, v. 27, p. 351–357, 2009.
33. DÂMASO, A. **Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
 34. DÂMASO, A. **Obesidade**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.
 35. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia . IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.** v.88, 2007.
 36. DE SOUZA, C. A.; SHAPIRO, L. F.; CLEVINGER, C. M.; DINENNO, F. A.; MONAHAN, K. D.; TANAKA, H.; SEALS, D. R. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation**, v. 102, p. 1351-1357, 2000.
 37. DOMINGUEZ, L. J.; BARBAGALLO, M. The cardiometabolic syndrome and sarcopenic obesity in older persons. **J Cardiometab Syndr**, v. 2, p. 183-189, 2007.
 38. DUARTE, J. A. R.; MOTA, J. Obesidade, síndrome metabólica e atividade física: estudo exploratório realizado com adultos de ambos os sexos, da Ilha de S. Miguel, Região Autónoma dos Açores, Portugal. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp**, v.19, p. 317-28, 2005.
 39. DUBOIS, M.; GILLES. K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v. 28, p. 350-6, 1956.
 40. DUNCAN, B. B.; SCHIMIDT, M. A. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. **São Paulo Med J**, v. 119, p. 122-127, 2001.
 41. DURSTINE, J. L.; HASKELL, W. L. Effects of exercise on plasma lipids and lipoproteins. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 22, p. 477-521, 1994.
 42. EDMA, Associação Europeia de Fabricantes de Meios de Diagnóstico, 2007: <http://www.apifarma.pt/areas/div/Documents/Diabetes.pdf>
 43. EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O.; MELLO, M. T.; TUFIK, S.; DAMASO, A. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, p. 182-187, 2008.
 44. ESCRIVA, E.; AGOTE, M.; RUBIO, E. J.; MOLERO, J. C. A.; PASCUAL-LEONE, A. M.; ANDRES, S. A. J.; CARRASCOSA, J. M. In Vivo Insulin-Dependent Glucose

- Uptake of Specific Tissues Is Decreased during Aging of Mature Wistar Rats. **Endocrinology**, v. 138, p. 49–54, 1997.
45. FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 1º Congresso Internacional de Pré-Diabetes e Síndrome Metabólica. Berlim: 2005.
 46. FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 8, p. 760-5, 2007.
 47. FIDALGO, M.; FALCÃO, T. F.; BENTO, S. A.; DE OLIVEIRA, E.; NOGUEIRA, J. F.; DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; DE CASTRO, R. M.; LEANDRO, C. G. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 1, p.1-8, 2012.
 48. FIGUEIRA, J. L.; CARVALHO, E. T. F.; PAPALÉO, M. N.; PASINI, U.; THOMSEN, Y. G.; ANDRIOLLO, A. Alterações lipídicas em idosos portadores de diabetes melito não insulínodpendente/ Lipid changes in elderly individuls with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Rev. Paul. Med**, v. 106, p. 89-94, 1998.
 49. FINK, R. I.; HUECKSTEADT, T.; KARAOGHLANIAN, Z. 1986 The effects of aging on glucose metabolism in adipocytes from Fisher rats. **Endocrinology**, v. 118, p. 1139–1147, 1986
 50. FLETCHER, G. F.; BLAIR, S. N.; BLUMENTHAL, J. Statement on exercise, Benefits and recommendation for physical activity programs for all amercians. A statement for helth professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the council on clinical cardiology, **Am Heart Assoc Circul**, v. 83, p. 340-344, 1992
 51. FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: finding from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, v. 287, p. 356–359, 2002.
 52. GEIRSDOTTIR, O. G.; ARNARSON, A.; BRIEM, K.; RAMEL, A.; JONSSON, P. V.; THORSDDOTTIR, I. Effect of 12-Week Resistance Exercise Program on Body Composition, Muscle Strength, Physical Function, and Glucose Metabolism in Healthy, Insulin-Resistant, and Diabetic Elderly Icelanders. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 11, p. 1259-65. 2012.

53. GHANBARI-NIAKI, A.; KRAEMER, R. R.; ABEDNAZARI, H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. **Horm Metab Res**, v. 2, p.112-6, 2011
54. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; BOTEZELLI, J. D.; RIBEIRO, R.; DALIA, R. A.; MELLO, M. A. R. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. **Diabetol Metab Syndr**, v. 4, p. 1-7, 2012.
55. GHEZZI, A. C.; CAMBRI, L. T.; RIBEIRO, C.; BOTEZELLI, J. D.; MELLO, M. A. R. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 3, 2011
56. GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; DE AZEVEDO, J. R.; DOS SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem and Physiol**, v. 130, p. 21-27, 2001.
57. GOMES, R. J.; CAETANO, F. H.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. **J Exerc Physiol Online**, v. 8, p. 16-25, 2005.
58. GORDON, N. F.; SCOTT, C. B.; WILKINSON, W. J.; DUNCAN, J. J.; BLAIR, S. N. Exercise and mild hypertension: recommendations for adults. **Sports Med.**, v. 10, p. 390-404, 1990.
59. GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 15, p. 2003-2007, 2005.
60. GROOP, L. filter your current search Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, p. 683-9, 2001.
61. GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE, P. J.; SMITH, S. C.; SPERTUS, J. A.; COSTA, F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v. 112, p. 2735 - 2752, 2005.
62. GUEDES, D. P.; GONÇALVES, L. A. V. V. Impacto da prática habitual de atividade física no perfil lipídico de adultos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, p. 72-78, 2007.
63. GULVE, E. A.; HENRIKSEN, E. J.; RODNICK, K. J.; YOUN, J. H.; HOLLOSZY, J. O. Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1- to 25-mo-old rats. **Am J Physiol**, v. 264, p. E319-27, 1993.

64. GUS, I.; FISCHMANN, A.; MEDINA, C. Prevalência dos fatores de risco da doença arterial coronariana no estado do rio grande do sul. **Arq bras. Cardiol**, v. 78, p. 478-83, 2002.
65. HARNAFI, H.; BOUANANI, N. H.; AZIZ, M.; CAID, H. S.; GHALIM, N.; AMRANI, S. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR – 1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. **J Ethnoph**, v. 109, p. 156-160, 2007.
66. HARRIS, M. I.; COWIE, C. C.; STERN, M. P.; BOYKO ES, REIBER GE, BENNETT PH. **Diabetes in America**. GPO, v. 95-1468, 1995
67. HARRIS, M. I.; FLEGAL, K. M.; COWIE, C. C.; EBERHARDT, M. S.; GOLDSTEIN, D. E.; LITTLE, R. R.; WEIDMEYER, H. M.; BYRD-HOLT, D. D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose tolerance in U.S. adults: the Third National Health and Nutritional Examination Survey, 1988–1994. **Diabetes**, v. 21, p. 518–524, 1998.
68. HAVEMAN-NIES, S.; DE GROOT, L. C. P. G. M.; STAVEREN, W. A. V. Dietary quality, lifestyle factors and healthy aging in Europe: the SENECA study. **Age and Aging**, v. 32, p. 427–434, 2003.
69. HAYES, J. P.; CHAPPELL, M. A. Individual consistency of maximal oxygen consumption in deer mice. **Funct. Ecol**, v. 4, p. 495-503, 1990.
70. HEATH, G.W.; HAGBERG, J. M.; EHSANI, A. A.; HOLLOSZY, J. O. A physiological comparison of young and older endurance athletes. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 51, p. 634–640, 1981.
71. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int J Sports Med**, v. 6, p. 117-130, 1985.
72. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios. 2002. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>. Acesso em: 15 jun. 2011.
73. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). The IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. 2006. Acessado em: 30 Abr.2010. Disponível em: <http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429.9>.
74. ISOMAA, B.; ALMGREN, P.; TUOMI, T.; FORSÉN, B.; LAHTI, K.; NISSÉN, M.; TASKINEN, M. R.; GROOP, L. filter your current search Cardiovascular

- morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, p. 683-9, 2001.
80. ISSURIN, V. B. Block periodization versus traditional training theory: a review. **J Sports Med Phys Fit**, v. 48, p. 65–75, 2008.
 81. KAHN, R.; BUSE, J.; FERRANNINI, E.; STERN, M. The metabolic Syndrome: time for critical appraisal. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2289-2304, 2005.
 82. KARTZEL, L. I.; BLEECKER, E. R.; COLMAN, E. G.; ROGUS, E. M.; SORKIN, J. D.; GOLDBERG, A. P. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary artery disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA**, v. 274, p. 1915-1921, 1995.
 83. KASCH, F. W.; BOYER, J. L.; VAN CAMP, S. P.; VERITY, L. S.; WALLACE, J. P. The effects of physical activity and inactivity on aerobic power in older men (a longitudinal study). **Phys Sportsmed**, v. 18, p.73-83, 1990.
 84. KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B. H. Effects of exercise on glucose homeostasis in type 2 diabetes mellitus. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, p. S495-501, 2001.
 85. KELLEY, D. E.; THAETE, F. L.; TROOST, F.; HUWE, T.; GOODPASTER, B. H. KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S.; TRAN, Z. V. Exercise, lipids, and lipoproteins in older adults: a meta-analysis. **Prev Cardiol**, v. 8, p. 206-214, 2005.
 86. KERN, M.; DOLAN, P. L.; MAZZEO, R. S.; WELLS, J. A.; LYNIS DOHM, G. Effect of aging and exercise on GLUT-4 glucose transporters in muscle. **Am J Physiol**, v. 263, p.E362–E367, 1992.
 87. KLAUS, S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. **Current drug targets**, v. 5, p. 241-50, 2004.
 88. KLIMES, I.; VRANA, A.; KUNES, J.; SEBOKOVA, E.; DOBESOVA, Z.; STOLBA, P.; ZICHA, J. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. **Bood Pressure**, v. 4, p. 137-142, 1995.
 89. KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; LACHIN, J. M.; WALKER, E. A. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v. 346, p. 393-403, 2002.
 90. KNOWLER, W. C.; NELSON, R. G.; SAAD, M.; BENNETT, P. H.; PETTITT, D. J. Determinants of diabetes mellitus in the Pima Indians. **Diabetes Care**, v. 16, p. 216-27, 1993.

91. LERARIO, D. D. G.; GIMENO, S. G.; FRANCO, L. J.; IUNES, M.; FERREIRA, S. R. G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, p. 1, 2002
92. LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, A. S.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18, p. 132-142, 2003.
93. LIMA NKC. Sobrecarga Salina Crônica Em Ratos Wistar Eleva A Pressão Arterial e Aumenta O Metabolismo da Glicose, Sem Modificar A Sensibilidade À Insulina. 1995. Doutorado em Medicina (Nefrologia). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
94. LIN, J. L.; ASANO, T.; SHIBASAKI, Y.; TSUKUDA, K.; KATAGIRI, H.; ISHIHARA, H.; TAKAKU, F.; OKA, Y. Altered expression of glucose transporter isoforms with aging in rats selective decrease in GluT4 in the fat tissue and skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 34, p. 477-82, 1991.
95. LO, M. S.; LIN, L. L.; YAO, W. J.; MA, M. C. Training and detraining effects of the resistance vs. endurance program on body composition, body size, and physical performance in young men. **J Strength Cond Res**, v. 8, p. 2246-54, 2011.
96. LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R.; CARVALHEIRA, J. B.; PERES, S. B.; REIS, M. A.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; VELLOSO, L. A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**, v. 147, p. 149-157, 2002.
97. LUNDBAECK, K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v. 2, p. 1507-1513, 1962.
98. MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiol Behav**, v. 55, p. 621-5, 1994.
99. MARTIN, B. J. I. S.; MAUDSLEY, S.; MATTSON, M. P. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. **PNAS**, p.1-7, 2010.
100. MATHE, D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. **Diabetes Metab**, v. 21, p. 106 – 111, 1995
101. MATHEWS, J. N. S.; ALTAMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br Med J**, v. 27, p. 230-5, 1990.

102. MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS, T. L. N. Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, v. 8, 2000.
103. MATTERN, C. O.; GUTILLA, M. J.; BRIGHT, D. L.; KIRBY, T. E.; HINCHCLIFF, K. W.; DEVOR, S. T. Maximal lactate steady state declines during the aging process. **Journ of Applied Physiol**, v. 95, p. 2576-2582, 2003.
104. MATTHAEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H. H.; HAMANN, A.; KREYMAN, G.; GRETEN, H. Potential mechanism of insulin resistance in ageing: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of the intracellular pool of glucose transporters in Fisher rat adipocytes. **J Endocrinol**, v. 126, p. 99–107, 1990.
105. MATTHAEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H. H.; HAMANN, A.; KREYMAN, G.; GRETEN, H. Potential mechanism of insulin resistance in ageing: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of the intracellular pool of glucose transporters in Fisher rat adipocytes. **J Endocrinol**, v. 126, p. 99–107, 1990.
106. MEIGS, J. B. Epidemiology of the metabolic syndrome. **Am J Manag Care**, v. 8, p. S283-92, 2002.
107. MIKŁOSZ A, KONSTANTYNOWICZ K, STEPEK T, CHABOWSKI A. The role of protein AS160/TBC1D4 in the transport of glucose into skeletal muscles. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 6, p.270-6, 2011.
108. MILLER, G. D.; NICKLAS, B. J.; DAVIS, C. C.; LEGAULT, C.; MESSIER, S. P. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. **J Nutr Health Aging**, v. 16, p. 169-74, 2012.
109. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Pratique Saúde contra a Hipertensão Arterial. Acesso em: 28 jun. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23616
110. MITSUHASHI, T.; YAMADA, C.; IIDA, A.; HIRATSUKA, N.; INABE, F.; ARAIDA, N.; MORIYAMA, K.; SASAMORI, H.; SASAMORI, N.; MIYACHI, M.; TAKAHASHI, E. Long-term detraining increases the risk of metabolic syndrome in Japanese men. **Tokai J Exp Clin Med**, v.4, p. 95-9, 2011.
111. MOTA, C. S. A.; RIBEIRO, C.; ARAUJO, G. G.; ARAUJO, M. B.; MANCHADO, F. B.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. **BMC Endocr Disord (Online)**, v. 8, p. 1-9, 2008.

112. MOURA, R. F.; RIBIERO, C.; OLIVEIRA, J. A.; STEVANATO, E.; MELLO, M. A. R. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **Br J Nutr**, v. 101, p. 1178–1184, 2009.
113. NARIMIYA, M.; AZHAR, S.; DULKAS, C. B.; MONDON, C. E.; SIMS, C.; WRIGHT, D. W.; REAVEN, G. M. Insulin resistance in older rats. **Am J Physiol**, v. 246, p. E397–E404, 1984.
114. NEWBY, F. D.; DIGIROLAMO, M.; COTSONIS, G. A.; KUTNER, M. H. Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 259, p. 1117-1125, 1990.
115. NUNES, W. M. S.; MELLO, M. A. R.. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 541-548, 2005.
116. NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. **Métodos de bioquímica clínica**, p. 153-168, 1990.
117. NUNGENT, A. P. The metabolic syndrome. **Nutr Bull BNF**, v. 29, p. 236-43, 2004.
118. OLIVEIRA, C. A. M., LUCIANO, E., MARCONDES, M. C. C. G., MELLO, M. A.R. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **J. diabetes its complicat**, v. 21, p. 258 - 264, 2007.
119. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) - World Health Organization: Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, WHO, 1999.
120. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. **WHO Technical Report series** n. 854. Geneva, 1995.
121. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Prevenção de doenças crônicas um investimento vital. 2005.
122. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS): Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, WHO, 1999.
123. ORMSBEE, M. J.; ARCIERO, P. J. Detraining Increases Body Fat and Weight and Decreases VO₂peak and Metabolic Rate. **J Strength Cond Res**, v. 8, p. 2087-95, 2011

124. PAFFENBARGER, R. S.; JUNG, D. L.; LEUNG, R. W.; HYDE, R. T. Physical activity and hypertension: an epidemiological view. **Ann Med Helsinki**, v. 23, p. 319-327, 1991.
125. PAGE, C. P.; HOFFMAN, B.; CURTIS, M.; WALKER, M. **Farmacologia integrada**. São Paulo: Manole, p. 178-190, 1999.
126. PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; DE ALMEIDA, J. A. L.; LUCIANO, E.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 5, p. 323-9, 2010.
127. PAULI, R. J.; LEME, J.; CRESPILO, D.; MELLO, M. A. R.; ROGATTO, G.; LUCIANO, E. Influencia do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo pituitária adrenal de ratos administraos com dexametasona. **Rev. Port. Cien. Desp**, v.5, 2005.
128. PEDRO, R. E. L. Relação entre o número de dentes, medidas antropométricas e síndrome metabólica nos idosos de Porto Alegre. 2008. Dissertação (mestrado em gerontologia biomédica). Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
129. PELLIZZON, M.; BUISSON, A.; ORDIZ, F. J.; SANTA ANA, L.; JEN, C. Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats. **Obes Res**, v. 10, p. 947-955, 2002
130. POLLOCK, M. L.; DAWSON, G. A. Physiologic responses of men 49 to 65 years of age to endurance training. **J Am Geriatr Soc**, v. 24, p. 97-104, 1976.
131. REAVEN, G. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.
132. ROCHA, J. C. Avaliação clínica do paciente hipertenso. **Rev. Soc. Cardiol**, v. 1, p. 8-17, 1999.
133. ROZOWSKI, J.; ARTEAGA, A. The problem of obesity and its shocking characteristics in Chile. **Rev Med Chile**, v. 125, p. 1217 - 24, 1997.
134. SANAL, E.; ARDIC, F.; KIRAC, S. Effects of aerobic or combined aerobic resistance exercise on body composition in overweight and obese adults: gender differences. a randomized intervention study. **Eur J Phys Rehabil Med**, 2012.

135. SANTOS, A. P.; MARINHO, D. A.; COSTA, A. M.; IZQUIERDO, M.; MARQUES, M. C. The effects of concurrent resistance and endurance training follow a detraining period in elementary school students. **J Strength Cond Res**, v. 6, p. 1708-16, 2012.
136. SILVA, R. C. Q.; MIRANDA, W. L.; CHACRA, A. R.; DIB, A. S. Metabolic syndrome and insulin resistance in normal glucose tolerant brazilian adolescents with family history of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, p. 716-8, 2005.
137. SNOWLING, N. J.; HOPKINS, W. G. Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v. 29, p. 2518-2527, 2006.
138. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. *Arq Brás cardiol*, v. 77, p. 1-48, 2001.
139. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.43, 1999.
140. SOUZA, M. S. F.; LEME, R. B.; FRANCO, R. R.; ROMALDINI, C. C.; TUMAS, R.; CARDOSO, A. L.; DAMIANI, D. Síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Rev Paul Pediatr**, v. 25, p. 214-220, 2007.
141. SPOSITO, A. C.; CAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Brasil Cardiol**, v. 88, p. 01-19, 2007.
142. STEVENS, J. Impact of age on associations between weight and mortality. **Nutr Rev**, v.58:129-37, 2000.
143. STEWART, A. L.; GREENFIELD, S.; HAYS, R. D.; WELLS, K.; ROGERS, W. H.; BERRY, S. D.; MCGLYNN, E. A.; WARE, J. E. JR. Functional status and wellbeing of patients with chronic conditions: results from the Medical Outcomes Study. **JAMA**, v. 262, p. 907-913, 1989.
144. KELLEY, D.E.; THAETE, F. L.; TROOST, F.; HUWE, T.; GOODPASTER, B. H. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** n.278, E941-E948, 2000.
145. TAKESHIMA, N.; KOBAYASHI, F.; WATANABE, T.; TANAKA, K.; TOMITA, M.; POLLOCK, M. L. Cardiorespiratory responses to cycling exercise in trained and

- untrained healthy elderly: with special reference to the lactate threshold. **Diabetes Metab**, v. 16, p. 290-5, 1990.
146. THE EUROPEAN GROUP FOR THE STUDY OF INSULIN RESISTANCE (EGIR): Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. **Diabetes Metab**, v. 28, p. 364-76, 2002.
 147. THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. **Circulation**, v. 106, p. 3143-3421, 2002.
 148. TWISK, J. W. R.; KEMPER, H. C. G.; VAN MECHELEN, W. The relationship between physical fitness and physical activity during adolescence and cardiovascular disease risk factors at adult age. The Amsterdam growth and health longitudinal study. **Int J Sports Med**, v. 23, p. 8-14, 2002.
 149. VALLE, T.; TUOMILEHTO, J.; ERIKSSON, J. EPIDEMIOLOGY OF NIDDM IN EUROPIIDS. **Inter Textbook Diabetes Mellitus**, p. 125-42, 1997.
 150. VAN DEN BRANDT, J.; KOVACS, P.; KLOTING, I. Features of the metabolic syndrome in the spontaneously hypertriglyceridemic W (istar) O (ttawa) K (arlsburg) W (RT1u) rat. **Metabolism**, v.49, p. 1140 – 1144, 2000b.
 151. VAN DEN BRANDT, J.; KOVACS, P.; KLOTING, I. Metabolic features in disease-resistant as well as in hypertensive SHR and newly established obese WOKW inbred rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, p. 1618–1622, 2000a.
 152. VARADAY, K. A.; EBINC, N.; VANSTONE, C. A. Plant sterols and endurance training combine to tavorably alter plasma lipid profiles in previously sedentary hypercholesterolemic adults after 8 wk. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1159-66, 2004.
 153. VOGLER, C. M.; MENANT, J. C.; SHERRINGTON, C.; OGLE, S. J.; LORD, S. R. Evidence of Detraining After 12-Week Home-Based Exercise Programs Designed to Reduce Fall-Risk Factors in Older People Recently Discharged From Hospital. **Arch Phys Med Rehabil**, 2012.
 154. WAREMAN, N. J.; WONG, M. Y.; HENNINS, S.; MITCHELL, J.; RENNIE, K.; CRUICKSHANK, K. et al. Quantifying the association between habitual energy expenditure and blood pressure. **Int. J. Epidemiol.**,v. 29, p. 655-60, 2000.
 155. WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JR AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1796–1808, 2003.

156. WHO - World Health Organization: Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, WHO, 1999.
157. WILLETT, W. C.; DIETZ, W. H.; COLDITZ, G. A. Guidelines for health weight. **N Engl J Med**, v. 341, p.427-34, 1999.
158. WILLIAMS, R. E.; RATHBONE, D. A.; MOODY, P. C.; SCRUTTON, N. S.; BRUCE, N. C. Degradation of explosives by nitrate ester reductases. **Biochem Soc Symp**, v. 68, p. 143-53, 2001.
159. WILMORE e COSTIL. Fisiologia do Exercício. 1 ed. São Paulo: Manole, 2003.
160. World Healh Organization (WHO): 10 facts on obesity, fev. 2010 [Acesso em: 27 de fev. 2010]. Disponível em <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>.
161. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - World Health Organization: Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, WHO, 1999.
162. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).World Health Organization Technical report series 894: "Obesity: preventing and managing the global epidemic."Geneva, 2000.
163. XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1821–1830, 2003.
164. YONG-WOO PARK, MD, PHD; SHANKUAN ZHU, MD, PHD; LATHA PALANIAPPAN, MD; STANLEY HESHKA, PHD; MERCEDES R. CARNETHON, PHD; STEVEN B. HEYMSFIELD, MD. Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Arch Intern Med**, v. 163, p. 427-436, 2003.
165. ZIMMET, P. Z.; KELLY, W. L. Challenges in diabetes epidemiology: from West to the rest. **Diabetes Care** , v. 15, p. 232-52, 1992.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO NA DIABETOLOGY & METABOLIC SYNDROME .

RESEARCH

Open Access

Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages

Ana Carolina Ghezzi*, Lucieli Teresa Cambri, José Diego Botezelli, Carla Ribeiro, Rodrigo Augusto Dalia and Maria Alice Rostom de Mello

Abstract

In recent decades, metabolic syndrome has become a public health problem throughout the world. Longitudinal studies in humans have several limitations due to the invasive nature of certain analyses and the size and randomness of the study populations. Thus, animal models that are able to mimic human physiological responses could aid in investigating metabolic disease. Thus, the present study was designed to analyze metabolic syndrome markers in albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of different ages. The following parameters were assessed at two (young), four (adult), six (adult), and twelve (mature) months of age: glucose tolerance (glucose tolerance test); insulin sensitivity (insulin tolerance test); fasting serum glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol concentrations; glucose uptake in isolated soleus muscle; and total lipid concentration in subcutaneous, mesenteric, and retroperitoneal adipose tissue. We found that aging triggered signs of metabolic syndrome in Wistar rats. For example, mature rats showed a significant increase in body weight that was associated. In addition, mature rats showed an increase in the serum concentration of triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol, which is characteristic of dyslipidemia. There was also an increase in serum glucose compared with the younger groups of animals. Therefore, aging Wistar rats appear to be an interesting model to study the changes related to metabolic syndrome.

Keywords: Metabolic syndrome, Biochemical parameters, Metabolism, Aging, Wistar rats

Introduction

Metabolic syndrome is characterized by a combination of risk factors for cardiovascular disease and diabetes that are generally linked to insulin resistance and central obesity [1]. Cardiovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality in the world [2]; therefore, the study of metabolic syndrome as a predictor of cardiovascular problems is critical.

Aging correlates with an increase in the prevalence of cardiovascular disease, which is a health concern, especially because of increases in the life expectancy of the world population. The aging of the world population has caused concerns about the balance of the age pyramid. Studies have estimated that the proportion of people over 65 years of age, which was 5.2 % in 1950, will increase to 15.6 % in 2050; thus, the elderly will represent one fifth of the world population [3].

The prevalence of metabolic syndrome in the population of the United States is 20-25 % and close to 55 % for the elderly [4]. In Brazil, a metabolic syndrome prevalence of 52.3 % was observed in the elderly; however, due to different definitions for metabolic syndrome, the prevalence may differ among studies [3].

The most commonly used definition for metabolic syndrome is the one given by the World Health Organization (WHO), which requires the presence of diabetes or insulin resistance and two of the following characteristics: a high waist/hip ratio, a high concentration of triglycerides or a low concentration of HDL cholesterol, increased blood pressure and urinary excretion of albumin [5].

Research using animal models that develop a complete case of metabolic syndrome, including all of the above mentioned risk factors, are rare. Studies have demonstrated that the Wistar Ottawa Karlsburg (WOKW) line of rats develops a complete case of metabolic syndrome that includes obesity, moderate hypertension, dyslipidemia, glucose intolerance, and hyperinsulinemia [6].

* Correspondence: carolighezzi@gmail.com
Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP - Universidade Estadual Paulista), Rio Claro, SP, Brazil



© 2012 Ghezzi et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Another circumstance that leads to the manifestation of metabolic syndrome symptoms in rodents is the aging process; however, manifestation differs between rat strains. For example, the Fisher 344 rat, which has been widely used in studies that separately assess metabolic syndrome characteristics [7], shows a small increase in body weight at 24 months of age. In this strain, adipocyte size is markedly increased, and plasma insulin concentrations are slightly higher in mature rats. Wistar rats at twenty-four months of age show similar blood insulin levels as adult rats at three months [8] despite the large increase in body weight and adipocyte hyperplasia [9]. Wistar rats also show a decrease in peripheral glucose uptake [10] as they age. Furthermore, recent studies have emphasized that the conditions considered as "standard" for the general maintenance of laboratory rodents (e.g., collective cages containing two to five animals per cage, with a flooring of wood shavings and free access to food) could favor the development of metabolic syndrome. This phenomenon could make rodent models suitable models of human obesity [11].

Relatively few studies have simultaneously monitored the development of various metabolic syndrome markers resulting from aging in Wistar rats, which have been widely used in experiments in Brazil and in several different studies conducted by our research group [12-14]. Therefore, the present study was designed to analyze metabolic syndrome markers in albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) at different ages.

Materials and methods

Animals

The present study used albino Wistar rats between two and twelve months of age. The rats were obtained from the central animal facility of São Paulo State University – UNESP – Botucatu, São Paulo, Brazil and were kept in the animal facility of the Department of Physical Education of the São Paulo State University – UNESP – Rio Claro, São Paulo, Brazil. The rats were fed a standard, balanced rodent diet LABINA (Purina®. Composition: a control diet (57,3 % carbohydrate, 41,2 % of cornstarch), 200 g protein, 70 g lipids, 50 g fiber, minerals and vitamins are balanced to the species) and water *ad libitum* and were kept in collective plastic cages (four per cage) at a room temperature of 25°C and a 12-h light/12-h dark cycle. The protocol for the animal studies was subjected to the Ethics Committee on Animal Use from the Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro (CEUA), under protocol 2638.

Experimental design and groups

The rats were assessed for metabolic syndrome markers at different ages:

- group 2 months (n = 8) – at two months (young adult);
- group 4 months (n = 8) – at four months (adult);

- group 6 months (n = 8) – at six months (adult);
- group 12 months (n = 8) – at twelve months (mature).

Assessment prior to sacrifice

• General assessments:

All animals had their body weight, nasoanal length and food intake recorded each week. The food intake was calculated per cage, using the formula:

$$\text{Food intake} = \frac{\text{Daily Food Intake (grams)}}{\sum \text{body weight of the rats in each cage (grams)}}$$

• Oral glucose tolerance test – OGTT:

The glucose tolerance of the rats was assessed by the oral glucose tolerance test (OGTT). This test was performed during the last week of the experiment after 12 h of fasting and began when the first blood sample was taken from a cut at the tip of the tail (time 0). Subsequently, a 20 % glucose solution (2 g/kg body weight) was administered to the rats via a polyethylene gastric tube. Blood samples were collected after 30, 60, and 120 min with heparinized capillary tubes, and 25-μL aliquots were used to determine the glucose and insulin concentrations. A single cut at the tip of the tail was enough to collect all of the blood samples. Blood glucose concentrations were determined using the glucose-oxidase method, and insulin concentrations were determined using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (LABORLAB®). The results were analyzed with ORIGIN software by calculating the area under the curve (AUC) for serum glucose and insulin using the trapezoidal method test [15].

• Insulin tolerance test - ITT

Peripheral insulin sensitivity was assessed by the insulin tolerance test (ITT), which was carried out 48 h after the OGTT. After the ITT, a crystalline insulin solution (30 IU/100 g body weight, LILLY) was administered subcutaneously. Blood samples were collected after 30, 60, and 120 min with heparinized capillary tubes, and 25-μL aliquots were used to determine the concentration of glucose by the glucose-oxidase method. A single cut at the tip of the tail was enough to collect all of the blood samples. The glucose removal rate (KITT), which was expressed as %/minute, was calculated using the following formula: $(0.0693/t/2) \times 100$. Using ORIGIN software, blood glucose (t/2) was calculated by the least squares curve analysis for blood glucose content from the moments when serum glucose decreased after insulin administration [16].

• Animal sacrifice and collection of the biological material

When the rats reached a predetermined age, they were all sacrificed by decapitation under deep anesthesia with CO₂ (i.e., 48 h after the last *in vivo*

assessment). Blood samples were collected for serum separation for glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL cholesterol, and HDL cholesterol concentrations determination by calorimetric methods using commercial kits (LABORLAB).

• Soleus muscle

Longitudinal muscle slices weighing approximately 25–35 mg were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer enriched with glucose (5.5 mM). The buffer contained [3 H]-2-deoxyglucose (2-DG, 0.5 μ Ci/mL) and insulin (100 mU/mL), and the slices were incubated in glass flasks for approximately 1.5 h under continuous gassing with carbogen (O_2/CO_2 ratio of 95 %/5 %) and constant stirring in a water bath (37°C). Glucose uptake was assessed using 2-DG as a marker and measuring the radioactivity of [3 H] using a beta counter.

• Adipose tissue

The adipose tissue from the posterior subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal were analyzed. Mesenteric and retroperitoneal are visceral regions of the adipose tissue, they usually are used as markers of visceral adiposity. The excision of different fat

deposits was performed according to methods described by Cinti [17]. Data were expressed as a relation between regional adipose tissue weight (grams)/body weight (100 grams).

Statistics

The results were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) with a pre-established significance level of 5 %. When needed, the Newman-Keuls post hoc test was used.

Results

Figure 1 A, B and C show the increase in body weight, nasoanal length and food intake of the rats. Significant differences were observed in body weight and nasoanal length between two and four months of life. Additional significant increases in body weight and nasoanal length occurred from six to twelve months. For the figure we see that food intake to two months the animals eat more (g/100 g) and two months after intake decreases considerably, reaching an almost stable, with little fluctuation has one month to another.

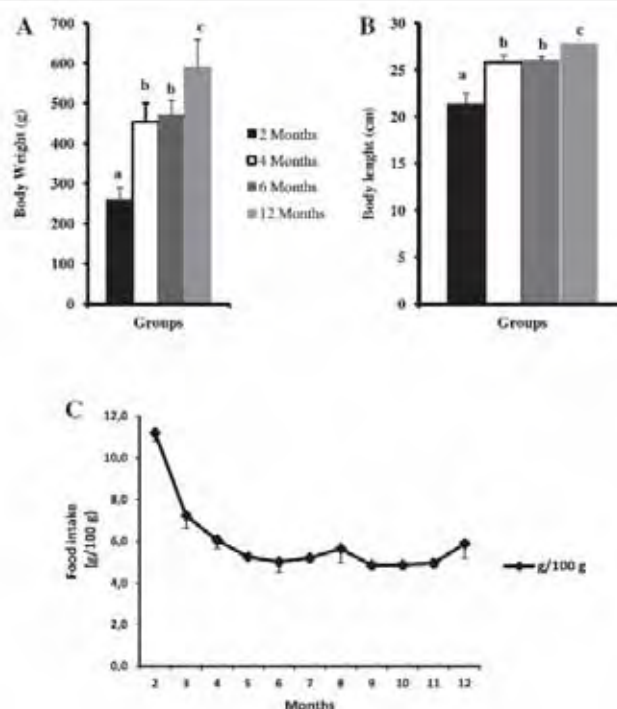


Figure 1 The mean and standard deviation for body weight (A) and nasoanal length (B) from groups containing eight rats each. All differences are expected in this range. Different letters mean different result. (One-way ANOVA and Newman-Keuls post hoc test, $P < 0.05$).

Figure 2, A and B show values for the blood glucose before and 30, 60, and 120 min after the glucose load and for the area under the curve of the blood glucose during the oral glucose tolerance test (OGTT). There were no statistical differences between the groups.

Figure 3, A and B show the blood glucose concentrations values before and 30, 60, and 120 min after exogenous insulin administration and the glucose removal constant (KITT) values during the insulin sensitivity test (ITT). There were no significant differences between the groups.

The values for the serum concentrations of glucose, triglycerides (mg/dL), total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol at the end of the experiment are shown in Table 1. Significant increases in serum glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol concentrations were observed in twelve-month-old rats compared with the other age groups.

Table 2 shows the data for the total lipids from the mesenteric, retroperitoneal, and subcutaneous regions. A statistically significant difference was observed between groups for mesenteric and retroperitoneal regions. The two-month group had less fat accumulation in all regions than the other groups, whereas the twelve-month group had greater accumulation only in the mesenteric region.

Figure 4 presents the glucose uptake values for the isolated soleus muscle. There were no significant differences between the groups.

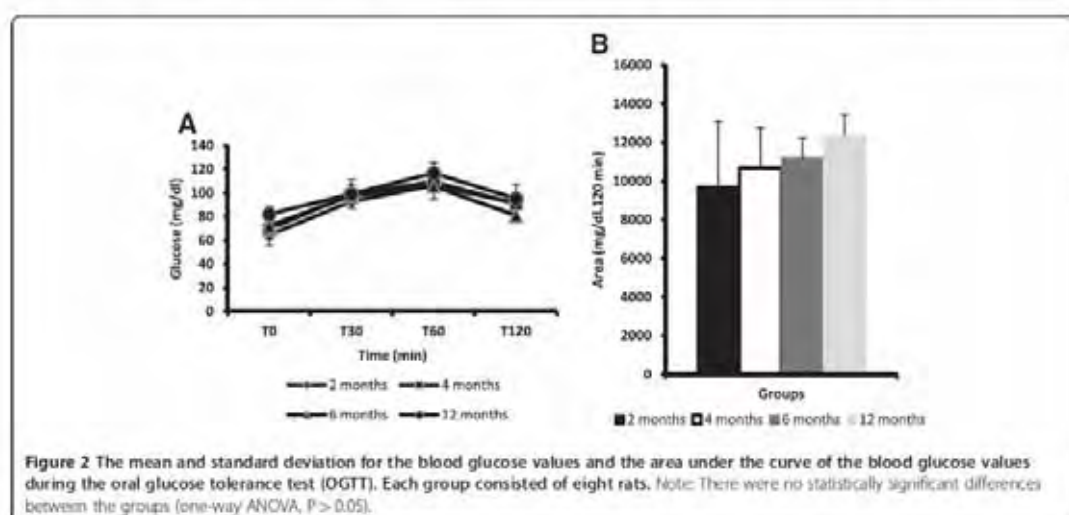
Discussion

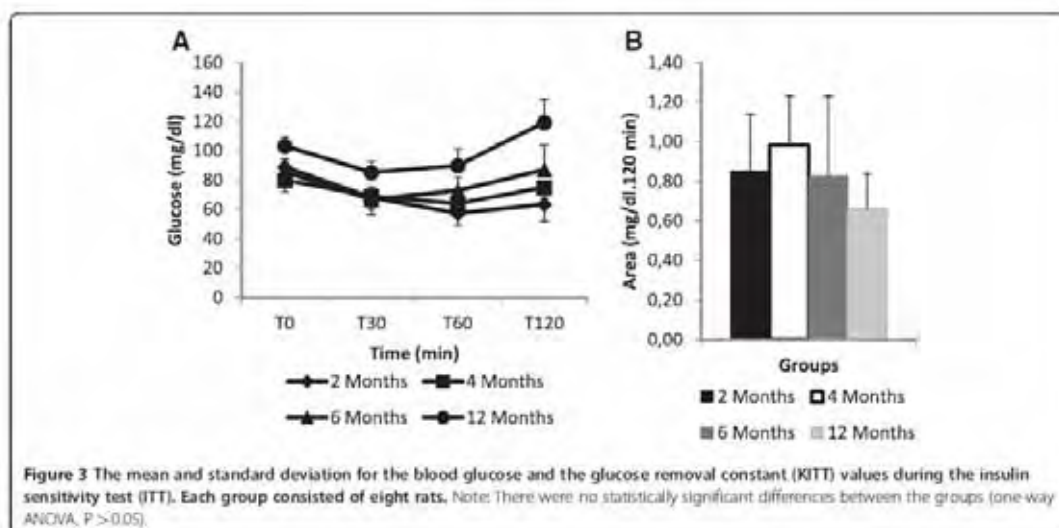
This study analyzed the effects of aging on the development of several metabolic syndrome markers in Wistar rats, which are often used in research, especially in Brazil.

The life expectancy of the world population has increased due to several factors, such as developments in medicine and improvements in basic sanitation. Longevity, however, is accompanied by several diseases. One condition that has attracted a lot of attention is metabolic syndrome because the prevalence of cases in the world population has increased exponentially [18]. Metabolic syndrome is association clinical signs of diseases that increase the risk of cardiovascular disease, which is the leading cause of death in the world.

Because of the relationship between metabolic syndrome and cardiovascular disease, there is a need to understand the mechanisms of metabolic syndrome. Thus, several studies have been conducted with experimental models because the analysis of metabolic syndrome mechanisms often includes invasive procedures, which are restricted from being used in humans. Magnetic resonance spectroscopy in humans provides a non invasive way to measure fat, glucose and glycogen in humans and rodents, and many such studies show such longitudinal and dynamic measures can successfully be made [19]. Rats and mice are among the animals most commonly used to study metabolic syndrome, and several rodent strains have been used.

The present study used albino Wistar rats and found that the rats in the two-month group had lower body weights compared with the other groups. The rats shows a marked gain in body weight from two to four months due to their stage of growth and development. Although body weight stabilized from four to six months, there was another significant weight increase at twelve months. A similar result has also been observed by Lerco et al. [20] in Wistar rats. The





food intake profile data showed that after two months there is stabilization of food intake, which agrees with literature data [21,22]. Similar to human beings, rats ate more during accelerated body growth with subsequent stabilization. These data indicate that increasing the weight gain of animals and an increase of mesenteric fat is not related to the increased food intake.

Ford et al. [4] used criteria defined by the NCEP and found that the prevalence of both obesity and metabolic syndrome in humans increases with age.

The results of the OGTT and ITT at two, four, six, and twelve months of age demonstrated that there was no change in the blood glucose level throughout the experimental period (i.e., neither glucose tolerance nor insulin sensitivity were affected). These findings were in agreement with previous studies that reported that Wistar rats at twenty-four months of age have similar blood insulin and blood glucose levels as three-month-old adult rats [8] despite increases in body weight and adipocyte hypertrophy [9].

Metabolic syndrome comprises several physiological disorders and those changes also affect the glucose transporters, regulation of homeostasis intra and extra-cellular

glucose is directly related to controlling the expression of genes that encode different glucose transporters [23]. The stimulation of insulin causes the translocation of GLUT4 to happen toward the plasma membrane thereby increasing glucose uptake, participating significantly in the control of glucose homeostasis [24].

At twelve months, the blood biochemistry of the rats showed an increase in the levels of triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol, which was characteristic of the onset of dyslipidemia. Interestingly, Mota et al. reported different results [12]; however, their animals were assessed for a shorter period of time (i.e., from weaning to 120 days of age), which could explain the difference between the present study and the study by Mota et al. [12]. The maintenance of high-circulating triglycerides concentration causes an imbalance in lipid and carbohydrate oxidation [25]. This phenomenon can increase plasma glucose, as observed in the present study was an increase in blood glucose at twelve months compared with the younger age groups. Interestingly, studies of mature diabetic patients have shown that these individuals have a higher risk to develop dyslipidemia than nondiabetic individuals [26].

Table 1 The means and standard deviations for the serum concentrations of glucose (mg/dL), triglycerides (mg/dL), total cholesterol (mg/dL), HDL cholesterol (mg/dL), and LDL cholesterol (mg/dL) (n = 8 per group)

Age	Glucose	Triglycerides	Total Cholesterol	HDL	LDL
2 months	98 ± 14 ^a	105 ± 30 ^a	82 ± 7 ^a	29 ± 8 ^a	64 ± 8 ^a
4 months	109 ± 8 ^a	100 ± 11 ^a	100 ± 10 ^a	48 ± 4 ^a	67 ± 3 ^a
6 months	119 ± 29 ^a	125 ± 33 ^a	100 ± 8 ^a	40 ± 6 ^a	63 ± 8 ^a
12 months	152 ± 29 ^b	260 ± 83 ^b	171 ± 30 ^b	79 ± 25 ^b	121 ± 19 ^b

Different letters indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA and Newman-Keuls post hoc test, $P < 0.05$).

Table 2 The means and standard deviations of total lipids (mg/100 g) in the adipose tissue from different regions (n = 8 per group)

Groups	Mesenteric	Retroperitoneal	Subcutaneous
2 months	1 005 ± 240 ^a	770 ± 212 ^a	692 ± 177 ^a
4 months	2 267 ± 726 ^b	2634 ± 536 ^b	1 851 ± 403 ^b
6 months	2475 ± 537 ^{ab}	2472 ± 408 ^{ab}	1 499 ± 381 ^b
12 months	4399 ± 643 ^c	3191 ± 703 ^b	1 896 ± 758 ^b

Different letters indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA and Newman-Keuls post hoc test, $P < 0.05$).

Another factor that has been associated with metabolic syndrome is visceral fat. Fat distribution is reported to be more closely linked to metabolic disorders than total body weight, and fat distribution is even more significant in older individuals [27]. Therefore, central body fat is a more reliable factor in the diagnosis of metabolic syndrome and other morbidities than the classification of the degree of obesity. Importantly, visceral fat is closely linked with the development of insulin resistance and other glucose alterations disorders.

Because glucose is an important substrate for muscles, it is of value to investigate the muscle metabolism of this substrate during the aging process in Wistar rats. Thus, the present study assessed glucose uptake in incubated soleus muscle. Interestingly, there were no statistically significant differences between the groups. These data can reveal the cause-effect order in the metabolic syndrome markers.

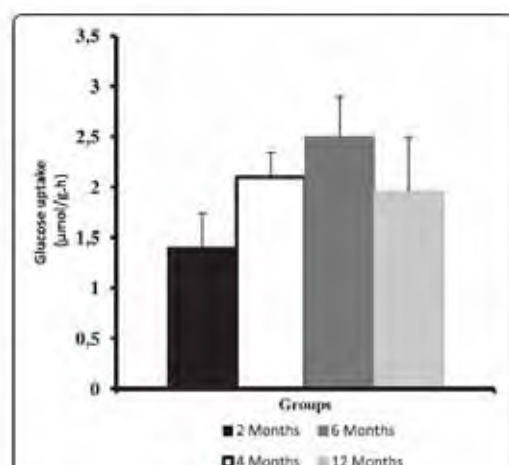


Figure 4 The mean and standard deviation for the glucose uptake (μmol/g/h) by the isolated soleus muscle. Each group consisted of eight rats. Note: There were no statistically significant differences between the groups (one-way ANOVA, $P > 0.05$).

As described before, the lipid metabolism was altered; this change can lead to future alterations in the carbohydrate metabolism [28]. The twelve month group showed higher concentration of serum glucose compared to the younger. This can be the first metabolic alteration found. Studies from our laboratory [29,30] using fructose to induce metabolic syndrome in rats, have demonstrated that the alterations in the lipid metabolism are more evident than glucose alterations.

Studies have shown that aging causes the spontaneous development of obesity and insulin resistance in rats. In addition, some studies have reported changes in glucose transporter type 4 (GLUT 4) content in mature rats; however, these studies used different rat strains and analyzed different muscles [31].

Conclusion

The aging process triggered metabolic syndrome characteristics in Wistar rats. Mature rats showed a significant increase in body weight and lipid content in adipose tissue. In addition, mature rats showed characteristics of dyslipidemia, such as increased serum triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol. Similarly, mature rats showed an increase in serum glucose compared with younger groups. Therefore, aging Wistar rats appear to be an interesting model for the study of the changes related to metabolic syndrome.

Competing interest

The authors have no conflicts of interest, and no section of the article has been or will be published in another journal.

Authors' contributions

ACG was responsible for experimental design, data collection, statistical analysis and preparation of the manuscript. LTC was responsible for experimental design, data collection and preparation of the manuscript. JDB and RAD was responsible for collecting data and preparing the manuscript. MARM, NO AKMM was responsible for experimental design and coordination of research. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank José Roberto and the other laboratory technicians and the São Paulo Research Foundation (FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, process number 2011/072896-0).

Received: 6 December 2011 Accepted: 27 April 2012
Published: 27 April 2012

References

- Duncan BB, Schmidt MA: Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *Sao Paulo Med J* 2001, **119**:122-127.
- World Health Organization (WHO): *Preventing chronic diseases: a vital investment*; 2008.
- Brasília Institute of Geography and Statistics IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: *Profile of Mature Heads of Households (Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios)*; 2002. <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/210/2002/pidosos.shtml>.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH: Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002, **287**:356-359.

5. WHO: *Third International Conference on Health Promotion*. Sweden: Sundsvall; 1991. Accessed on 06 April 2009. Available from: http://www.who.int/hpr/NPH/docs/sundsvall_statement.pdf.
6. Van den Brandt J, Kovacs P, Koting I: Metabolic features in disease-resistant as well as in hypertensive SHR and newly established obese WOKW inbred rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, **24**:1618-1622.
7. Carter GD, Linggi-Lung C, Kietzke EW: Persistent effects of exercise on skeletal muscle glucose transport across the life-span of rats. *J Appl Physiol* 1993, **75**:972-978.
8. Carrascosa JM, Ruiz P, Martinez C, Pulido JA, Satru SJ, Andres A: Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **160**:303-309.
9. Newby FJ, Digioia MA, Cohonts GA, Kulner MH: Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1990, **259**:1117-1125.
10. Escrivá E, Agote M, Rubio EJ, Molero JCA, Pascual-Leone AM, Andres SAJ, et al: In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology* 1997, **138**:49-54.
11. Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattsson MP: "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci* 2010, **107**:E134-E147.
12. Mota CSA, Ribeiro C, Araújo GG, Araújo MB, Machado FB, Oliveira CAM, et al: Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. *BMC Endocrinol (Online)* 2008, **8**:11.
13. Ghezzi AC, Cambri LT, Ribeiro C, Bottezell JD, Mello MAR: Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. *Lipids in Health Disease* 2011, **10**:3.
14. Cambri LT, Ghezzi AC, Ribeiro C, Dalla RA, Mello MAR: Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. *Nutr Res* 2010, **30**:156-162.
15. Matthews JNS, Altman DG, Campbell SM, Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 1990, **27**:230-235.
16. Bonora E, Moggi P, Zaccaro C, Cigolini M, Querena M, Cazzatoro V, et al: Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989, **68**:174-178.
17. Cinti S: The adipose organ. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids* 2005, **73**:9-15.
18. Meigs JB: Epidemiology of the metabolic syndrome. *Am J Manag Care* 2000, **6**(11 suppl):S283-S292.
19. Boesch C, Décombarz J, Slotboom J, Kreis R: Observation of intramyocellular lipids by means of ¹H magnetic resonance Spectroscopy. *Proc Nutr Soc* 1999, **58**:841-850.
20. Lerco MM, Spadella CT, Machado JM, Schellini AS, Padovani CB: Characterization of an experimental model of Diabetes Mellitus induced by alloxan in rats. Clinical and laboratory study. *Acta Cir Bras* 2003, **18**:132-142.
21. Takano S, Kawai S, Hosoya M, Ohta M, Uemitsu H, Miyazaki K: Oresin-A does not stimulate food intake in old rats. *APP - GI* 2004, **287**:81-88.
22. Morley JE: Decreased Food Intake With Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001, **56**:61-68.
23. Stenbit AE, Tsao Tsu-Shuen, Li J, Buzelnik R, Geenen DL, Factor SM, Housheericht K, Katz EB, Chilton MJ: GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 1997, **3**:1096-1101.
24. Rea S, James DE: Moving GLUT4: The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 1997, **46**:1667-1677.
25. Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membranebound transcription factor. *Cell* 1997, **89**:331-340.
26. Garvey WT, Kwon S, Zhong D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, Liao Y: Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 2001, **52**:453-462.
27. Forslund NG, Sattar N, McKelvie PM: Relation of C-reactive protein to body fat distribution and features of the metabolic syndrome in Europeans and South Asians. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001, **25**(9):1327-1331.
28. Machado UF, Shimizu I, Saito M: Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. *Physiol Behav* 1994, **55**:621-625.
29. Bottezell JD, Dalla RA, Res IMR, Barbieri RA, Bottezell TM, Pelarigo JS, Codogno J, Gonçalves R, Mello MAR: Chronic consumption of fructose rich soft drinks alters tissue lipids of rats. *Diabetol Metabol Syndr* 2010, **2**:43. doi:10.1186/1758-5996-2-43.
30. Bottezell JD, Mora RF, Dalla RA, Moura LP, Cambri LT, Ghezzi AC, Viltanelli FA, Mello MA: Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed a fructose-rich diet. *Lipids Health Dis* 2010, **9**:116.
31. Gulve EA, Henriksen EJ, Rodnick KJ, Young JH, Hollnagel JD: Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1- to 25-month-old rats. *Am J Physiol* 1993, **264**(3Pt1):E319-E327.

doi:10.1186/1758-5996-4-16

Cite this article as: Ghezzi et al.: Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012 **4**:16.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7.2 ANEXO 2: ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO INTITULADO:
CAPACIDADE AERÓBIA DE RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*, WISTAR)
EM DIFERENTES IDADES: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO.

AEROBIC CAPACITY OF WISTAR RATS AT DIFFERENT AGES: THE EFFECTS OF PHYSICAL TRAINING

ABSTRACT

Aging is a natural process of diminishment in normal physiological functions and capacities. However, it has been shown that engaging in regular physical exercise yields short- and long-term health benefits, primarily by mitigating the risk for cardiovascular disease. The aim of the present study was to analyze the aerobic capacity in response to physical conditioning in Wistar rats of different ages. Specifically, maximal lactate steady state (MLSS) was measured for each animal, as a proxy for aerobic capacity, and the effects of swimming training (at 80% of the MLSS) and subsequent deconditioning were assessed in Wistar rats at ages 2 (youth), 4 (young adult), 6 (adult) and 12 (mature adult) months old. The results were significant for weight gain in the sedentary and deconditioned animals at 12 months, whereas the conditioned group maintained their original body weights. As a measure of aerobic capacity, MLSS decreased with age, but physical exercise was effective in attenuating the age-related loss of aerobic capacity. Blood lactate levels did not vary during physical exercise in any of the groups. Therefore, aging reduces the aerobic capacity of sedentary animals, but physical exercise may decrease the deleterious effects of aging while also preventing weight gain.

KEYWORDS: aging, body weight, metabolic disease, maximal lactate steady state (MLSS), physical exercise.

1. INTRODUCTION

Aging is a growing cause of concern worldwide, and the rapid inversion of the age-stratified population pyramid reflects the increasing relevance of age-related health concerns. It has been estimated that the proportion of people older than 65 years old will have increased from 5.2% in 1950 to 15.6% by 2050 when the elderly will comprise one-fifth of the world's population (IBGE, 2002). Increasing life expectancy is the hard-fought result of public health interventions, development work and technological advancements that have been made in the healthcare field. However, the shifting shape of the population pyramid has drawn the attention of the public health community.

As a growing proportion of the global population increasingly qualifies as elderly, the burden of chronic, noncommunicable disease has increased, as well. Interest in health behavior modification and lifestyle-based approaches to health maintenance will remain significant in the years to come. Aging is a natural process through which the body's physiologic functions and capacities gradually diminish over time, especially from the third decade of life on when the progressive decline of functional capacity sets in. However, the speed at which this progressive loss of functional capacity occurs depends on various genetic factors, the presence of underlying health conditions and the lifestyle choices of the individual (POLLOCK et al. 1976).

While the adoption of a healthy lifestyle is recommended for people of all ages, it has been especially emphasized for aging individuals as a way to both prolong and improve one's quality of life. Although the activities and behaviors that constitute a healthy lifestyle may vary by context, it is reasonable to assume that most recommendations would involve some combination of a balanced diet and a physically active life (ANNEMIEN et al. 2003).

The literature consistently affirms that physical exercise results in a variety of benefits for the organism, such as weight control corporal (CARPENTER KC et al. 2012; MILLER et al. 2012), reduced body fat and increased lean body mass; reduced levels of low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol; and increased levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (GUEDES et al. 2007; KELLEY et al. 2005). Physical exercise also reduces resting blood glucose levels, improves the responsiveness of muscles to insulin (KARTZEL et al. 1995) and improves aerobic capacity and the autonomic regulation of arterial blood pressure (WAREMAN et al. 2000; DE SOUZA, 2000). In addition, there are also psychological and social benefits of exercise (CAMACHO et al. 1991).

Appropriate levels of cardiovascular fitness are protective against cardiovascular disease and inversely correlated with the presence of cardiovascular and metabolic risk factors (TWISK et al. 2002). Regular physical exercise and aerobic modalities, in particular, yield short- and long-term health benefits by mitigating the risk factors for cardiovascular disease (BLAIR et al. 1999), which is currently the primary cause of mortality for both males and females worldwide in developed and developing countries alike (VARADAY et al. 2004).

Physical exercise is more likely to produce the desired health benefits when it is prescribed on an individual basis and tailored to the goals and physical capacity of each person. These benefits can be achieved regardless of any underlying metabolic or other health-related disorders an individual may possess (CIOLAC et al., 2004).

While physical activities are increasingly incorporated into the everyday lives of aging individuals, there is an attendant interest in better understanding the physiological effects that physical conditioning exerts on the aerobic capacity of active individuals. For the purposes of this study, the maximal lactate steady state (MLSS) was chosen as the gold standard method for estimating the aerobic/anaerobic metabolic transition to identify age- and activity-related trends in aerobic capacity over time.

Several studies (CAMBRI et al. 2010a; CAMBRI et al. 2011; GHEZZI et al. 2011) were performed using experimental animal models to understand better the physiological and functional alterations that take place in the aging organism in response to physical exercise. Because many of the commonly employed techniques in these studies are invasive, unsafe and/or unethical for application in humans, animal models are used most often. In addition, longitudinal studies with human subjects are associated with a significant loss to follow-up. However, despite these concerns, it is worth noting that a series of studies on aging and aerobic capacity have, indeed, been conducted using human subjects. We discuss some of those studies later.

Human diseases have long been simulated in laboratory animals (CAMBRI et al. 2010b; GHEZZI et al. 2011; BOTEZELLI et al. 2010) for the purposes of studying the mechanisms of diseases on the molecular or systemic level. There is also great interest in understanding the response of several diseases and disease states to physical activity and, specifically, in identifying the optimal intensity of physical exercise for disease prevention or treatment.

The aim of the present study was to analyze the aerobic capacity in response to physical conditioning in Wistar rats of different ages. Specifically, maximal lactate steady state (MLSS) was measured for each animal, as a proxy for aerobic capacity, and the effects of swimming training, at 80% of the MLSS, and subsequent deconditioning were assessed in Wistar rats at ages 2 (youth), 4 (young adult), 6 (adult) and 12 (mature adult) months old.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

White Wistar rats aged 2-12 months were used. The animals were fed a balanced standard ration for rodents (Purina®), given water *ad libitum*, kept in collective cages (4 per cage) at room temperature 25 °C and exposed to a 12/12-hour light/dark photoperiod. All procedures involving the animals were subject to the approval by the Animal Use Ethics Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA) of the Institute of Biosciences, UNESP – Rio Claro in accordance with protocol 2638.

2.2. Design and Experimental Groups

The animals were assessed for their aerobic capacity at different ages:

Group 2S (n=8) – at 2 months old (youth);

Group 4S (n=8) – at 4 months old (young adult);

Group 6S (n=8) – at 6 months old (adult);

Group 12S (n=8) – at 12 months old (mature adult);

Group 12T (n=8) – subjected to physical training starting in young adulthood (at 4 months old) and lasting for the remainder of the study (until the animals were 12 months old). The animals were assessed at 12 months old;

Group 12D (n=8) – subjected to physical training starting in young adulthood (at 4 month old) and lasting for 4 months (until the animals were 8 months old). The animals were assessed at 12 months old.

2.3. Body weight and the sum of subcutaneous fat regions, retroperitoneal, and mesenteric.

Body weight was recorded once a week throughout the experiment. The adipose tissue from the posterior subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal were analyzed. Mesenteric and retroperitoneal are visceral regions of the adipose tissue, they usually are used as markers of visceral adiposity. The excision of different fat deposits was performed according to methods described by Cinti (2005). We carried out the sum of the regions of subcutaneous fat, mesenteric and retroperitoneal.

2.4. Physical Training

The animals in the physical training groups (12T and 12D) were subjected to swimming exercise in individual water tanks that were kept at 30 ± 1 °C, for 1 hour per day, 5 days per week. Each animal supported a lead weight tied to its thorax that equaled 80% of the workload required to achieve that individual animal's baseline MLSS. The animals were reassessed every 2 months for their MLSS to ensure that they were training with a constant 80% of their maximal workload.

2.5. Maximal Lactate Steady State - MLSS

For each animal, the identification of the metabolic transition zone, otherwise known as the aerobic capacity, was accomplished through maximal lactate steady state (MLSS) testing. MLSS is the highest blood lactate concentration that can be kept stable during one exercise bout, and it represents the steady state at which the rate of lactate entry into the bloodstream equals the rate of lactate removal under a constant load of exercise (HECK et al. 1985). MLSS testing is useful for assessing individual aerobic capacity and prescribing tailored exercise regimens. Previously, our research team described a protocol to measure MLSS in

rats during swimming exercise (GOBATTO et al. 2001), and we applied this methodology in the present study.

Briefly, the animals were subjected to several increasingly intensity swimming tests every 48 hours, involving constant workloads in each test, as percentages of body weight, until MLSS concentrations were achieved. Each test comprised 25 minutes of continuous swimming while supporting a workload, and blood samples were taken from a small cut in the end of the tail every five minutes. Serum lactate concentrations were measured by means of a lactate analyzer (model YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, USA). The MLSS was achieved once the difference in serum lactate concentrations between 10 and 25 minutes of exercise was equal to 1.0 mM or less.

2.6. STATISTICS

The results were analyzed by means of variance analysis (two-way ANOVA) at a 5% significance level. Newman-Keuls post-hoc test was applied when needed.

3.RESULTS

Table 1 depicts the data on mean body weights (g). The mean body weight increased after 2 months of age, stabilized between 4 and 6 months and subsequently increased once more by 12 months of age in sedentary and deconditioned rats. The mean body weight was maintained at the 4- and 6-month level in the group of exercising animals for the duration of the experiment. The total sum of the mesenteric fat, subcutaneous and retroperitoneal fat are also presented in Table 1, we observed that the animals at 2 months in these regions has less fat than all the groups and an interesting fact is that animals trained 12 months have a lower fat these regions of the groups 12 months and 12 months sedentary untrained.

Table 1

Figure 1 illustrates the various mean workloads at which the MLSS was reached, as aggregated by age and activity level. With increasing age, the mean workload required to reach the anaerobic threshold decreased. However, physical exercise succeeded in reducing the loss of aerobic capacity that accompanied increasing age, which is indicated by the greater mean workload required to achieve the MLSS in the 12T exercising group relative to the sedentary and deconditioned rats of the same age.

FIGURE 1:

Figure 2 depicts serum lactate concentrations (mmol/L) during exercise with a workload sufficient to achieve the maximal lactate steady state. There were no statistically significant differences among the groups.

FIGURE 2:

4.DISCUSSION

Physical activity plays an essential role in the prevention and treatment of several chronic degenerative diseases, contributes to increased life expectancy and improves the functional capacity of individuals in their everyday life activities.

Appropriate levels of cardiovascular fitness are protective against cardiovascular diseases and inversely correlated with the presence of cardiovascular and metabolic risk variables (TWISK et al. 2002). Regular exercise and aerobic activity, in particular, yield short- and long-term benefits by mitigating the risk factors for cardiovascular disease (BLAIR et al. 1999), which is currently the primary cause of mortality for both males and females worldwide in developed and developing countries alike (VARADAY et al. 2004).

Physical exercise is more likely to produce the desired health benefits when it is prescribed on an individual basis and tailored to the goals and physical capacity of each person. These benefits can be achieved regardless of any underlying metabolic or other health-related disorders an individual may possess (CIOLAC et al. 2004).

Our results show that the mean body weights of the study animals varied with age, increasing after the age of two months, which is a consequence of normal growth, and plateauing between 4 and 6 months when the animals were fully grown. Mean body weights increased again by age 12 months among the sedentary and deconditioned rats as a consequence of increased body fat content as demonstrated by the sum of subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal. According to the literature, physical training promotes weight maintenance and/or weight loss (EGUCHI et al. 2008; PELLIZZON et al. 2002), and indeed, the rats that engaged in 10 months of swimming exercise from the ages of 2-12 months remained at their 6-month weights for the study period, presumably through increased energy expenditure. Maintaining one's body weight at a healthy level is particularly important for the elderly because obesity is directly related to a series of metabolic disorders, and this age group is significantly more likely to bear the burden of chronic disease and debilitation.

According to the results of the present study, the mean workload required to achieve the MLSS decreased with increasing age but less so with regular exercise, reflecting the dynamic nature of aerobic capacity, its responsiveness to physical conditioning and the importance of routinely reassessing the aerobic capacity of physically active animals.

In the present study, the mean workload that was required to achieve the MLSS varied between 5% and 8% of the animal's body weight, and aging reduced the required workload. However, physical training was effective in preserving aerobic capacity, even in the animals that stopped training at 8 months. There were no significant differences between the mean workloads associated with the MLSS in the trained and deconditioned groups at 12 months

old, and both were similar to the mean workloads for the 4- and 6-month groups. In contrast, the aerobic capacity (and the workload associated with the MLSS) decreased in the sedentary animals as they aged.

Cunha et al. (2009), using 12 month-old rats, found that the mean workload associated with the MLSS was 5.4% of body weight among sedentary animals, which is similar to the current finding of 5.1% among the sedentary animals in this study. Moreover, the serum lactate concentrations at steady state were similarly unaffected by age and activity in both studies.

Mattern et al. (2003) assessed the aerobic capacities of conditioned human adolescents, of adults under 50 years old and of men more than 50 years old. The results of their study also showed that aerobic capacity and the workload required to reach the MLSS decrease with age without affecting the serum lactate concentrations at steady state.

Takeshima et al. (1996), also conducting a study with human subjects, found that maximum oxygen consumption (VO₂ max), as another measure of cardiovascular fitness and aerobic capacity, is higher in exercise-trained elderly individuals compared with sedentary or deconditioned individuals of the same age. The study authors concluded that physical activity mitigates the loss of aerobic capacity that is associated with advancing age.

The age-associated reduction in the workload that is required to achieve the MLSS is probably a truly age-related phenomenon, one that may be mediated through the glycogenic pathway and/or the lactate transport process (BOIS-JOYEUX B et al. 1990). Regardless of the specific biochemical pathways are most directly responsible for the reduction in aerobic capacity, physical exercise and training may exert a mitigating effect at this level.

In conclusion, it is becoming increasingly well-established that aging is associated with a reduction in the aerobic capacity of sedentary animals but that physical exercise can effectively attenuate the deleterious effects of age and prevent obesity. This is a significant

finding, because increased aerobic capacity is associated with better cardiovascular fitness and a lower incidence of cardiovascular and metabolic disease, including obesity (TWISK et al. 2002). These chronic conditions are associated with significant disability and have direct and long-term effects on one's quality of life.

ACKNOWLEDGMENTS: We are grateful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest, and no section of the article has been or will be published in another journal.

REFERENCES

- Annemien, H.N., Lisette, C.P.G.M., Groot, D.E., Wija, A., Staveren, V., 2003. Dietary quality, lifestyle factors and healthy aging in Europe: the SENECA study. **Age and Aging**. 32, 427–434
- Blair, S.N., Brodney, S., 1999. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. **Med. Sci. Sports Exerc.** 31, S646-62
- Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Peret, J., 1990. Age-dependent glycolysis and gluconeogenesis enzyme activities in starved-refed rats. **Diabetes Metab.** 16, 504-512
- Botezelli, J.D., Mora, R.F., Dalia, R.A., Moura, L.P., Cambri, L.T., Ghezzi, A.C., Voltarelli, F.A., Mello, M.A., 2010. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis.** 9, 116
- Camacho, T.C., Roberts, R.E., Lazarus, N.B., Kaplan, G.A., Cohen, R.D., 1991. Physical Activity and Depression: Evidence from the Alameda County Study. **Am. J. Epidemiol.** 134, 220–31
- Cambri, L.T., Ghezzi A.C, Ribeiro, C., Dalia, R.A., Mello, M.A.R., 2010. Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Nutr Res.** 30:156–162
- Cambri, L.T., Dalia, R.A., Ribeiro, C., Mello, M.A.R., 2010. Aerobic capacity of rats recovered from fetal malnutrition with a fructose-rich diet. *Applied Physiol Nutr Metabol.* 35: 490-497
- Cambri, L.T., ARAUJO, G.G., Ghezzi, A.C., Botezelli, J.D., Mello, M.A.R., 2011. Metabolic responses to acute physical exercise in young rats recovered from fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis.** 10, 164
- Carpenter, K.C., Strohacker, K., Breslin, W.L., Lowder, T.W., Agha, N.H., Mcfarlin, B.K., 2012. Effects of exercise on weight loss and monocytes in obese mice. *Comp Med.* 62:21-6
- Cinti, S., 2005. The adipose organ. **Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids.** 73: 9–15
- Ciolac, E.G., Guimarães, G.V. 2004. Exercício físico e síndrome metabólica. Physical exercise and metabolic syndrome. **Rev Bras Med Esporte.** 4: 319 – 324
- Cunha, R.R., Cunha, V.N.C., Segundo, P.R., Moreira, S.R., Kokubun, E., Campbell, C.S.G., Oliveira, R.J., Simões, H.G., 2009. Determination of the lactate threshold and

maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochemistry and Function** 27: 351–357

De Souza, C.A., Shapiro, L.F., Clevenger, C.M., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Tanaka, H., Seals, D.R. 2000., Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation**. 102:1351-1357.

Eguchi, R., Cheik, N.C., Oyama, L.M., Nascimento, C.M.O., Mello, M.T., Tufik, S., Damaso, A., 2008. Effects of the Chronic Exercise on the Circulating Concentration of Leptin and Ghrelin in Rats With Diet-induced Obesity. **Rev Bras Med Esporte**. 14:3

Ghezzi, A.C., Cambri, L.T., Ribeiro, C., Botezelli, J. D, Mello, M.A.R., 2001. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. **Lipids Health Dis**. 10:3

Ghezzi, A.C., Cambri, L.T., Botezelli, JD, Ribeiro, C.R., Dalia, R.A., Mello, M.A.R., 2012. Metabolic syndrome in rats at different ages. **Diabetol. Metab. Syndr**. 4: 16

Gobatto, C.A., de Mello M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp. Biochem. and Physiol.** 130: 21-27

Guedes, D.P., Gonçalves, L.A.V.V., 2007. Impacto da Prática Habitual de Atividade Física no Perfil Lipídico de Adultos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. 51: 72-78

Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., Hollmann, W., 1985. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. **Int. J. Sports Med**. 6: 117-130

Instituto brasileiro de geografia e estatística [brazilian institute of geography and statistics] (IBGE). 2011. Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios [Profile of elderly heads of households]. 2002. Available at:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>. Accessed on: 15 Jun

Kartzel, L.I., Bleecker, E.R., Colman, E.G., Rogus, E.M., Sorkin, J.D., Goldberg, A.P., 1995. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary artery disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA**. 274:1915-1921

Kelley, G.A., Kelley, K.S., Tran, Z.V., 2005. Exercise, lipids, and lipoproteins in older adults: a meta-analysis. **Prev. Cardiol**. 8:206-214

Mattern, C.O., Gutilla, M.J., Bright, D.L., Kirby, T.E., Hinchcliff, K.W., Devor, S.T., 2003. Maximal lactate steady state declines during the aging process. **Journ. of Applied Physiol**. 95: 2576-2582

- Miller, G.D., Nicklas, B.J., Davis, C.C., Legault, C., Messier, S.P. 2012. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. *J. Nutr. Health Aging* 16:169-74
- Pellizzon, M., Buison, A., Ordiz, F.J., Santa Ana, L., Jen, C., 2002. Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats. **Obes. Res.** 10: 947–955 doi: 10.1038/oby.2002.129
- Pollock, M.L., Dawson, G.A., 1976. Physiologic responses of men 49 to 65 years of age to endurance training. **J. Am. Geriatr. Soc.** 24: :97-104
- Takeshima, N., Kobayashi, F., Watanabe, T., Tanaka, K., Tomita, M., Pollock, M.L., 1990. Cardiorespiratory responses to cycling exercise in trained and untrained healthy elderly: with special reference to the lactate threshold. *Diabetes Metab.* 16:290-5
- Twisk, J.W.R., Kemper, H.C.G., Van Mechelen, W., 2002. The relationship between physical fitness and physical activity during adolescence and cardiovascular disease risk factors at adult age. The Amsterdam growth and health longitudinal study. **Int. J. Sports. Med.** 23: 8-14
- Varaday, K.A., Ebin, N. Vanstone, C.A., 2004. Plant sterols and endurance training combine to favorably alter plasma lipid profiles in previously sedentary hypercholesterolemic adults after 8 wk. **Am. J. Clin. Nutr.** 80: 1159-66
- Wareham, N.J., Wong, M.Y., Hennings, S., Mitchell, J., Rennie, K., Cruickshank, K., Day, N.E. 2002. Qualitifying association between habitual energy expenditure and blood pressure. **Int. J. Epidemiol.** 29: 655-60

Table: 1

Table 1: Values of mean and standard deviation of body weight and the sum of the mesenteric, subcutaneous and retroperitoneal fat depots weight for all groups.

Groups	Body weight	Sum *
2 S	269±10 ^a	18486±291 ^a
4 S	455±17 ^b	43789±550 ^b
6 S	471±37 ^b	44151±638 ^b
12 S	588±71 ^c	51314±994 ^c
12 T	515±72 ^b	38837±849 ^{ab}
12 D	576±62 ^c	55598±1176 ^c

Sum = sum of the total fat of the mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous. The different letters Indicate statistically significant differences (two-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$). Group 2S - sedentary at 2 months old; Group 4S - sedentary at 4 months old; Group 6S - sedentary at 6 months old; Group 12S - sedentary at 12 months old; Group 12T - trained at 12 months old; Group 12D - deconditioned at 12 months old.

Figures

Figure 1:

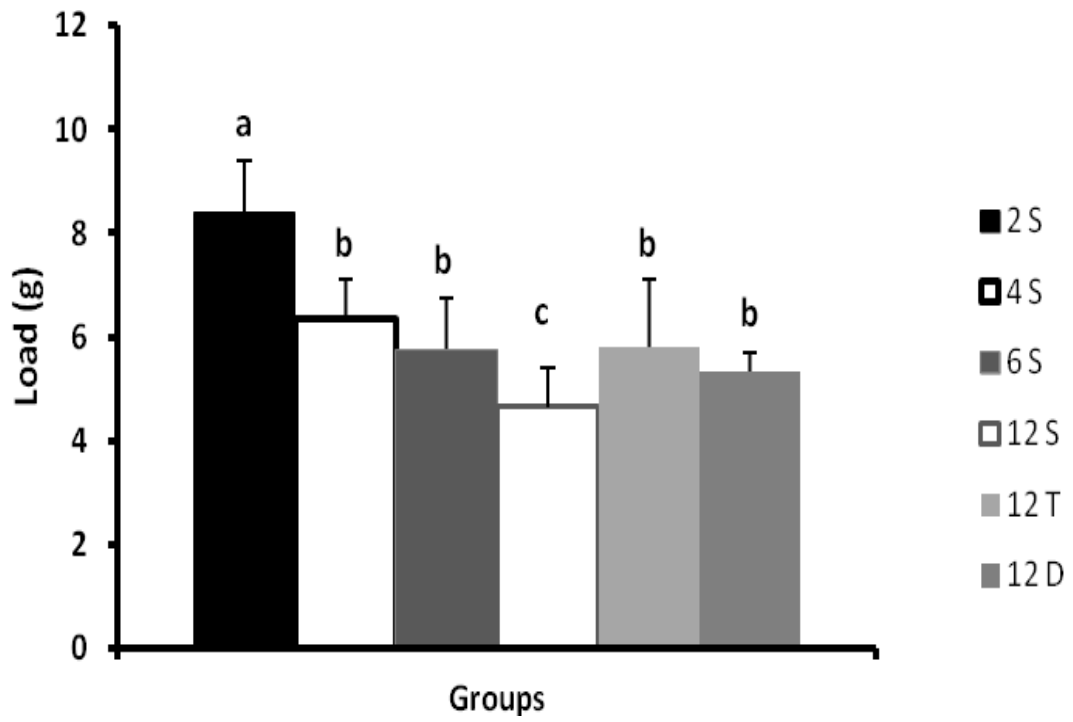


Figure 2:

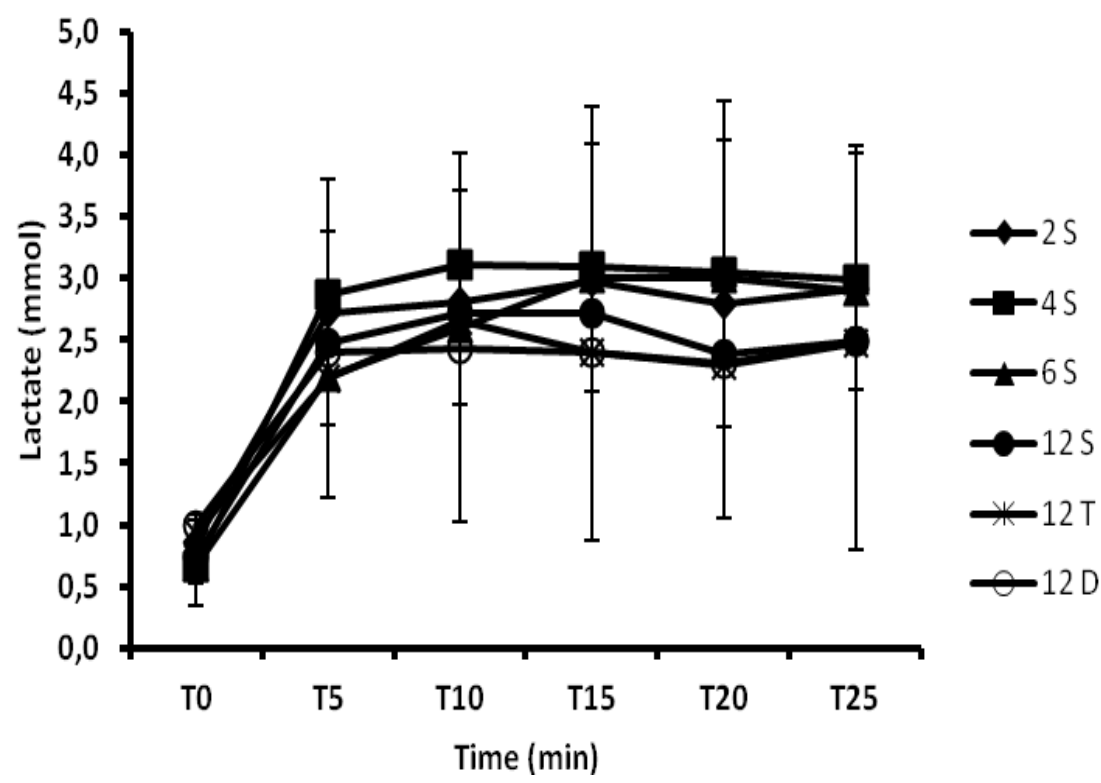


FIGURE LEGENDS

Figure 1: Workload means and standard deviations associated with MLSS in groups stratified by age and activity (N = 8 per group). The different letters indicate statistically significant differences (two-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$). **Group 2S** – sedentary at 2 months old; **Group 4S** – sedentary at 4 months old; **Group 6S** – sedentary at 6 months old; **Group 12S** – sedentary at 12 months old; **Group 12T** – trained at 12 months old; **Group 12D** – deconditioned at 12 months old.

Figure 2: Mean serum lactate concentrations (mmol/L) and standard deviations at the MLSS in groups stratified by age and activity level (N = 8 per group). **Group 2S** – sedentary at 2 months old; **Group 4S** – sedentary at 4 months old; **Group 6S** – sedentary at 6 months old; **Group 12S** – sedentary at 12 months old; **Group 12T** – trained at 12 months old; **Group 12D** – deconditioned at 12 months old.

7.3 ANEXO 3: ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO INTITULADO:
METABOLISMO MUSCULAR DA GLICOSE EM RATOS IDOSOS TREINADOS.

MUSCULAR GLUCOSE METABOLISM IN ELDERLY TRAINED RATS

Abstract

Obesity-associated metabolic diseases, such as hypertension, dyslipidemia and type-2 diabetes, cause 2.6 million mortalities each year.

This scenario of a global pandemic of metabolic diseases has encouraged the use of physical exercise as a non-medication treatment for various diseases and conditions

Wistar rats were used.. The study included three groups: Control (n=8) - not subject to physical training; Trained (n=8) – subjected to physical training at an intensity of 80% maximal lactate steady state (MLSS) from 4 months to 12 months; Detrained (n=8) – subjected to physical training at an intensity of 80% MLSS from 4 months to 8 months and assessed at 12 months.

Body weights were recorded weekly, and glucose tolerance tests and insulin tolerance tests were performed. Blood samples were collected to separate serum and determine glucose concentrations. Adipose tissues were removed for determination the lipid concentration in mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous. Portions of the heart, liver and soleus muscles were excised to determine glycogen concentrations. Glucose uptake by the soleus muscle was also evaluated.

Physical training at submaximal intensities induced important adjustments, including decreases in body weight and lipid concentration in the mesenteric adipose tissue and increases in exercise load in MLSS intensity, glucose tolerance, glycogen deposits and glucose uptake by skeletal muscle in trained animals.

KEYWORDS: aging, body weight, maximal lactate steady state (MLSS), physical exercise, glycogen, glucose uptake by skeletal muscle.

1. Introduction

Obesity-associated metabolic diseases, such as hypertension, dyslipidemia and type-2 diabetes, are responsible for the deaths of 2.6 million people annually, and projections indicate that this number will continue to grow, despite the adoption of preventive public policies (WHO, 2010).

The prevalence of Metabolic Syndrome has increased rapidly (FORD, ET. AL 2002). The effects of Metabolic Syndrome on the body are strong risk factors for cardiovascular disease, which affects most of the population and causes large numbers of deaths (Duncan, et al. 2001).

The International Diabetes Federation (2005) provides the most current definition for Metabolic Syndrome, and the following parameters are considered in the definition: central obesity and two of the following risk factors, diabetes or pre-diabetes, a low HDL-C level, high triglyceride levels and hypertension.

Although the genetic components of Metabolic Syndrome have been reported previously, the syndrome's etiology remains unknown. Obesity may trigger a low-level systemic or subclinical inflammation that leads to insulin resistance. Insulin resistance results in the accumulation of other disorders, which leads to Metabolic Syndrome (Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2003).

The risk for Metabolic Syndrome increases with age (Ghezzi et al. 2012), and studies of this complex syndrome and possible treatment approaches in the elderly are required because of increased life expectancy worldwide.

This scenario of a global pandemic of metabolic diseases has encouraged the use of exercise as a non-medication treatment for various diseases, such as diabetes mellitus, hypertension, obesity, changes in plasma lipids and insulin resistance (Carpenter et al., 2012;

Miller, 2012; Kartzel et al., 1995; De Souza, 2000; Camacho et al., 1991; Botezelli, et al., 2010; Botezelli, et al., 2011).

Physical exercise that is performed in a controlled manner (e.g., volume, frequency and intensity) provides several benefits to the body, including disease control and improvements in aerobic capacity (Botezelli, et al. 2011; Issurin, et al. 2008). A systematic program of physical training is expected to improve physical fitness (Araujo, et al., 2012).

Aerobic capacity, also known as $\text{VO}_{2\text{ max}}$, is the maximum amount of oxygen uptake, transport and use during an exercise session for the generation of energy (Hayes, et al., 1990).

Improvements in aerobic capacity over time are possible with regular physical exercise, but a decrease this capacity occurs in response to several factors, including a reduction in physical activity, chronic disease and aging (Carmeli, et al., 2003; Heath, et al., 1981). Aerobic capacity is an important parameter for training development and the evaluation of fitness improvement in athletes.

Physical exercise should be practiced in a chronic and controlled manner such that the generated adaptations in aerobic capacity persist. Physical training of a known intensity that is prescribed according to an individual's physical capacity makes the practice of physical exercise safer for individuals. The maximum lactate steady state (MLSS) test, which is the gold standard for determining the transition from predominantly aerobic/anaerobic exercise with a constant load, is often used.

Physical training also produces an increase in muscle glycogen (Araujo, et al. 2012; Ghanbari-Niaki, et al., 2011; Bergstrom, et al., 1967), which is an important substrate for energy generation during exercise. Therefore, an increase in the levels of muscle glycogen increases the available substrates and duration of energy generation, which may determine the duration of aerobic exercise (Bergstrom, et al., 1967).

Only muscles can use muscle glycogen, but the liver, which has a greater concentration of glycogen, can release glucose into the bloodstream via glycogenolysis, which is an important mechanism for glucose homeostasis (Consoli, et al., 1992).

The increase in skeletal muscle glucose uptake is important for improving glycemia in diabetic and normoglycemic individuals, and physical exercise increases glucose uptake by voluntary muscles (Luciano et al., 2002).

Therefore, the effect of systematic submaximal physical exercise on muscle glucose metabolism was investigated in 12-month-old Wistar rats.

2. Methods

2.1 Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used in the present study. The experiment was initiated in 2-month-old animals, and these animals were maintained until 12 months of age. The rats were reared collectively (4 animals per cage) in plastic cages, fed a standard rodent diet (Purina) and provided water *ad libitum* at an ambient temperature of 25 °C and a photoperiod of 12 hours of light and dark. The Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro (“Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro” - CEUA) approved all of the procedures performed on animals under protocol 2638.

2.2 Design and Experimental Groups

The rats were separated into three groups based on the training received:

Control Group (n=8) – not subjected to physical training and assessed at 12 months;

Trained Group (n=8) – subjected to physical training at an intensity of 80% MLSS starting in early adulthood (four months old), maintained until the end of the study (12 months) and evaluated at 12 months;

Detrained group (n=8) – subjected to physical training at an intensity of 80% MLSS starting in early adulthood (four months old), lasting four months, stopped at eight months of age and evaluated at 12 months.

2.3 Physical Training

Animals in the trained and detrained groups performed swimming exercise in individual water tanks at 30 ± 2 °C, 1 hour per day, 5 days a week. Lead weights were tied to the rat's chest, which represents 80% of the load equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition as identified by the MLSS. The MLSS was evaluated every two months to readjust the training loads.

2.4 Maximal Lactate Steady State - MLSS

The MLSS established the aerobic/anaerobic metabolic transition zones during swimming and evaluated the aerobic capacity of the animals. The MLSS is equivalent to the highest concentration of lactate entry into the blood circulation, which is counterbalanced by lactate removal during exercise under constant loads (Heck et al. 1985). MLSS determinations are useful in exercise prescriptions and assessments of aerobic capacity. Our research group recently described a protocol for MLSS determinations in rats during swimming exercise (Gobatto et al. 2001), and this protocol was used in the present study.

Briefly, the animals performed various swimming tests while supporting constant and increasing exercise loads in relation to their body weight at 48-hour intervals until a stabilization of blood lactate concentrations during the exercise session was no longer possible. Each test included 25 minutes of continuous swimming while supporting a weight. Blood was collected every 5 minutes via a small cut at the tail tip to assess lactate

concentrations. Lactate concentrations were determined in a blood lactate analyzer (YSI 1500 Sport, Yellow Springs, OH, USA). The stabilizing criterion was a difference equal to or less than 1.0 mM blood lactate between 10 and 25 minutes of exercise.

2.5 Body weight

Body weights were recorded at the end of the experiments using a digital scale.

2.6 Glucose Tolerance Test – GTT:

The GTT was employed to evaluate the glucose tolerance of the animals. This test was performed during the last week of the experiments after a 12-hour fast in the first blood collection from a cut at the tail tip (time 0). The animals received a 20% glucose solution (2 g/kg body weight) via a polyethylene gastric tube. Blood samples were collected after 30, 60 and 120 minutes using heparinized capillaries and were calibrated to 25 μ L volume for determinations of glucose and insulin levels. A single cut at the tail tip was sufficient to collect all blood samples. The glucose-oxidase method determine blood glucose levels, and commercial ELISA kits (LABORLAB®) measured insulin levels. The results were analyzed using the area under the curve of serum glucose during the test by the trapezoidal method in ORIGIN software.

2.7 Insulin Tolerance Test - ITT

The insulin tolerance test (ITT) evaluated peripheral insulin sensitivity. This test was performed 48 hours after the GTT in the first blood collection from the cut tail tip of the animal (time 0). The animals were injected subcutaneously with a crystalline insulin solution (LILLY U 40) at a dose of 30 UI/100 g body weight. Blood samples were collected after 30, 60 and 120 minutes using heparinized capillaries and calibrated to a 25- μ L volume to determine glucose concentrations via the glucose-oxidase method. A single cut at the tail tip

was sufficient to collect all blood samples. The removal rate of glucose (KITT), expressed in %/minute, was calculated using the formula, $0.0693/t/2 \times 100$. Blood glucose (t/2) was calculated with ORIGIN software using a least squares curve analysis of blood glucose levels following insulin administration, during which serum glucose levels decay.

2.8 Animal sacrifice and collection of biological materials

The rats were deeply anesthetized with CO₂ 48 hours after the last "in vivo" assessment and were euthanized by decapitation. Blood samples were collected to separate serum and glucose using commercially available kits (LABORLAB[®]).

2.9 Adipose tissue

Adipose tissues from the mesenteric, retroperitoneal and posterior subcutaneous regions of the rats were removed for determination the lipid concentration (NOGUEIRA et al., 1990). The excision of different fat deposits was performed according to Cinti (2005).

2.10 Liver, heart and soleus skeletal muscle

Portions of the heart, liver and soleus muscle were excised to determine glycogen levels using the method of Dubois et al. (1956).

2.11 Soleus muscle

Longitudinal muscle slices weighing approximately 25 - 35 mg were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate medium enriched with glucose (5.5 mM) containing [³H] 2-deoxyglucose (0.5 µCi/ml) [2-DG] and insulin (100 mU/ml) in glass vials for approximately 1.5 hours with continuous O₂/CO₂ (95%/5%) gas under constant stirring in a water bath (37°C). Glucose uptake was evaluated using the 2-DG as a marker, and radioactivity [³H] was measured with the aid of beta particle counter.

2.12 Statistics

The results were analyzed using an analysis of variance (one-way ANOVA) at a pre-set significance level of 5%. The Newman-Keuls post-hoc test was used when necessary.

3. Results

Table 1 presents the values of blood glucose and the area under the glucose curve during the GTT. Control animals exhibited a larger area under the glucose curve than did the other groups. The detrained animals tended to display larger areas than did the trained group.

Table 1

Table 2 presents the values of blood glucose and the glucose removal constant (KITT) during the ITT. No statistically significant differences were observed between groups.

Table 2:

The following values of the exercise loads relative to body weights (%) for the MLSS were observed: Control = 4.6 ± 0.4^b , Trained = 5.8 ± 1.3^a , Detrained = 5.3 ± 0.4^a . The control animals exhibited a lower exercise load relative to the body weight (%) in the MLSS compared to Trained and Detrained animals.

Table 3 presents the body weights and lipid concentration in mesenteric, retroperitoneal and posterior subcutaneous tissues. Significant differences in body weights and mesenteric tissues were observed. The Trained animals exhibited lower values for these variables.

Table 3:

No significant differences in the values of serum glucose were observed (Table 4). However, statistically significant differences in muscle glycogen levels in the soleus muscle, liver and heart were observed (Table 4). Trained animals exhibited higher glycogen concentrations compared to Control and Detrained animals. Table 4 presents the glucose uptake values of the isolated soleus muscles. The Trained and Detrained groups exhibited higher values than the Control group.

Table 4:**4. Discussion**

Physical exercise that is performed in a controlled manner (e.g., with a specific frequency, volume and intensity) provides several benefits to the body, such as disease control and improvements in aerobic capacity. Improved physical fitness is expected using a systematic program of physical training (Araujo, et al., 2012).

Our results demonstrated that exercise reduced the area under the glucose curve in Trained animals. This result is an important adaptation because smaller values on the glucose curve during the GTT indicate an improved body response to glucose exposure (hyperglycemia) in which glucose absorption into the bloodstream is more efficient. Therefore, exercise prevents glucose intolerance, which is extremely important because glucose intolerant individuals exhibit an increased risk (11%/year) of developing type-2 diabetes compared to normal individuals (Knowler, et al., 2002). Exercise also decreases glucose intolerance (Castaneda, et al., 2002; Motta, et al., 2008; Fidalgo, et al., 2012).

Insulin sensitivity not altered in any of the experimental groups, which suggests that the improvements in glucose tolerance were due to changes in the translocation of glucose transport (GLUT)-containing vesicles from the cytoplasm to the cell membrane. This translocation increases the intracellular entry of glucose.

Control animals exhibited a lower MLSS workload compared to the Trained and Detrained groups, which corroborates previous studies (Ferreira, et al., 2007; Santos, 2012). Interestingly, the Detrained animals exhibited a relative MLSS workload that was greater than the Controls, but this value was reduced compared to the Trained animals. These results suggest that the adaptations in this parameter persisted until the end of the experiment.

Decreases in body weight and the lipid concentration of mesenteric adipose tissues were observed in the Trained group, which is consistent with previous results reported in the

literature (Sanal, 2012, Carpenter, et al., 2012; Miller, 2012). The increase of fat in the mesenteric region is closely linked to insulin resistance and other metabolic disorders (Lerario, et al., 2002). The Detrained animals did not exhibit decreased body weight compared with the control group, possibly because these animals remained inactive for 4 months, which supports a reduction in calorie expenditure compared to the Trained group. Therefore, physical exercise must be maintained throughout the life of the individual to maintain metabolic adaptations, such as increases in basal metabolism. MS (2011) demonstrated that individuals who trained aerobically for a period of time and were subsequently maintained for 24 weeks without training (i.e., “detrained”) lost the achieved adjustments with training and exhibited an increase in body weight and reductions in VO_{2max} . Other studies (Vogler, et al., 2012; Mitsuhashi, et. al., 2011; Ormsbee, et al., 2011) have argued that detraining produced losses in aerobic capacity, altered body composition and decreased basal metabolism, flexibility and balance. These results are observed in athletes and healthy adults with physical restrictions.

Physical training did not modify serum glucose levels. Physical exercise does not improve glucose levels in elderly normoglycemic individuals, but exercise effectively lowers glycemia in elderly pre-diabetics (Geirsdottir, et al., 2012).

Exercise effectively increased muscle glycogen stores in trained animals in the present study. However, the muscle glycogen levels in Detrained animals were similar to the Control animals at the end of the experiment due to the long period of detraining. This result confirms the findings of Pauli (Pauli, et al., 2005) who also observed an increase in muscle glycogen in animals subjected to physical training for 10 weeks. These results are also similar to previous studies (Araujo, et al., 2012; Ghanbariniaki, et al., 2011). Muscle glycogen stores are important in the performance of prolonged exercise because this substrate is required for muscle contractions (Bergstrom, et al., 1967).

However, physical training did not alter glycogen deposits in the liver and the heart, which suggests that the GLUTs in hepatocytes, cardiac myocytes and muscle cells are distinct, and the adaptations to exercise may be different.

Glucose is an important substance for the performing of muscular work, and differences in muscular metabolism between trained, detrained and control (sedentary) animals should be discussed. Therefore, glucose uptake in incubated soleus muscle was evaluated. Trained animals exhibited an increased glucose uptake compared to the Detrained and Control animals, which suggested that regular exercise exerts a beneficial effect on glucose uptake (Luciano, et al., 2002). Previous studies have also demonstrated that physical exercise, including acute activity, increases the phosphorylation of the insulin receptor, which enhances glucose uptake in elderly animals (Pauli, et al., 2010).

Therefore, physical exercise at submaximal (80% of MLSS) intensities induced important changes, such as reductions in body weight and the lipid concentration of mesenteric adipose tissue and increases in the exercise load, as measured by MLSS intensity, glucose tolerance, deposits of muscular glycogen and glucose uptake by skeletal muscle in Trained animals. Physical exercise with submaximal characteristics is more attractive and easily adopted by the healthy population and individuals with a type of metabolic disorder, such as Metabolic Syndrome.

5. REFERENCES

1. Bergstrom, J., Hermansen, L., Hultman, E., Saltin, B. 1967. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand.* 71, 140-50.
2. Botezelli, J.D, Moura, R.F., Dalia, R.A., Moura, L.P., Cambri, L.T., Ghezzi, A.C., Mello, M.A.R. 2010. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *Lipids in health and disease.* 9, 116.
3. Botezelli, J.D., Cambri, L.T., Ghezzi, A.C; Dalia, R.A., Scariot, P.P.M., Ribeiro, Carla., Voltarelli, F.A., Mello, M.A.R. 2011. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* 3, 35.
4. Camacho, T.C., Roberts, R.E., Lazarus, N.B., Kaplan, G.A., Cohen, R.D. 1991 Physical Activity and Depression: Evidence from the Alameda County Study. *Am. J. Epidemiol.* 134, 220–31.
5. Castaneda, C., Layne, L.E., Orians, L.M., Gordon, P.L., Walsmith, J., Foldvari, M. 2002. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25, 2335-41.
6. Cinti S. 2005 The adipose organ. *PLEFA.* 73, 9–15.
7. Consoli, A. 1992. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care.* 15, 430-41.
8. de Araujo, G.G., Papoti, M., Dos Reis, I.G., de Mello, M.A., Gobatto, C.A. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2012 Mar; 112(3):839-52. Epub 2011 Jun 17.
9. De Souza, C.A., Shapiro, L.F., Clevenger, C.M., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Tanaka, H., Seals, D.R. 2000. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. **Circulation.** 102, 1351-1357.
10. Dubois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-6.

11. Duncan, B.B., Schimidt, M.A. 2001. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *Sao Paulo Med. J.* 119, 122–127.
12. Ferreira, J.C., Rolim, N.P., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., Brum, P.C. 2007. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 760-5.
13. Fidalgo, M., Falcão-Tebas, F., Bento-Santos, A., de Oliveira, E., Nogueira-Neto, J.F., de Moura, E.G., Lisboa, P.C., de Castro, R.M., Leandro, C.G. 2012. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br. J. Nutr.* 1, 1-8.
14. Ford, E.S., Giles, W.H., Dietz, W.H. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 287:356–359.
15. Geirsdottir, O.G., Arnarson, A., Briem, K., Ramel, A., Jonsson, P.V., Thorsdottir, I. 2012. Effect of 12-Week Resistance Exercise Program on Body Composition, Muscle Strength, Physical Function, and Glucose Metabolism in Healthy, Insulin-Resistant, and Diabetic Elderly Icelanders. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 10.
16. Ghanbari-Niaki, A., Kraemer, R.R., Abednazari, H. 2011. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. *Horm. Metab. Res.* 43, 112-6.
17. Ghezzi, A.C., Cambri, L.T., Botezelli, J.D., Ribeiro, C., Dalia, R.A., Mello, M.A.R. 2012. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. Ghezzi et al. *Diabetol. Metabol. Syndr.* 4, 16.
18. Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E. 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. and Physiol.* 130A, 21-27.
19. Hayes, J.P., Chappell, M.A. 1990. Individual consistency of maximal oxygen consumption in deer mice. *Funct. Ecol.* 4, 495-503.
20. Heath, G.W., Hagberg, J.M., Ehsani, A.A., and Holloszy, J.O. 1981. A physiological comparison of young and older endurance athletes. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 51, 634–640.
21. Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., Hollmann, W. 1985. Justification for 4.0 Mmol/L Lactate Threshold. *Int. J. Sports. Med.* 6, 117-130.

22. International Diabetes Foundation. 2005. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 1° International Pre-Diabetes and Metabolic Syndrome Congress. Berlin (“Congresso Internacional de Pré-Diabetes e Síndrome Metabólica. Berlin”).
23. Issurin, V.B. 2008. Block periodization versus traditional training theory: a review. *J. Sports. Med. Phys. Fit.* 48, 65–75.
24. Kartzel, L.I., Bleecker, E.R., Colman, E.G., Rogus, E.M., Sorkin, J.D., Goldberg, A.P. 1995. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary artery disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA.** 274, 1915-1921.
25. Knowler, W.C., Barrett-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, 393-403.
26. Lerario, D.D.G., Gimeno, S.G., Franco, L.J., Iunes, M., Ferreira, S.R.G. 2002. Weight excess and abdominal fat in the metabolic syndrome among Japanese-Brazilians (“Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros”). *Rev. Saúde Pública.* 36: 1.
27. Lo, M.S., Lin, L.L., Yao, W.J., Ma, M.C. 2011. Training and detraining effects of the resistance vs. endurance program on body composition, body size, and physical performance in young men. *J. Strength. Cond. Res.* 25, 2246-54.
28. Luciano, E., Carneiro, E.M., Carvalho, C.R., Carvalheira, J.B., Peres, S.B., Reis, M.A, Saad, M. J., Boschero, A.C., Velloso, L.A. 2002. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Europ. J. Endocrinol.* 147, 149-157.
29. Miller, G.D., Nicklas, B.J., Davis, C.C., Legault, C., Messier, S.P. 2012. Basal growth hormone concentration increased following a weight loss focused dietary intervention in older overweight and obese women. *J. Nutr. Health Aging.* 16, 169-74.
30. Mitsuhashi, T., Yamada, C., Iida, A., Hiratsuka, N., Inabe, F., Araida, N., Moriyama, K., Sasamori, H., Sasamori, N., Miyachi, M., Takahashi, E. 2011. Long-term detraining increases the risk of metabolic syndrome in Japanese men. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 36, 95-9.
31. Ormsbee, M.J., Arciero, P.J. 2011. Detraining Increases Body Fat and Weight and Decreases VO2 peak and Metabolic Rate. *J. Strength. Cond. Res.* 24.

32. Pauli, J.R., Leme, J., Crespilho, D., Mello, M.AR. Rogatto, G., Luciano, E. 2005. Influence of physical training on the parameters of the adrenal hypothalamic pituitary axis of rats treated with dexamethasone. *Rev. Port. Cien. Desp.* 5, 2.
33. Pauli, J.R., Ropelle, E.R., Cintra, D.E., De Souza, C.T., da Silva, A.S., Moraes, J.C., Prada, P.O., de Almeida Leme, J.A., Luciano, E., Velloso, L.A., Carvalheira, J.B., Saad, M.J. 2010. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech. Ageing. Dev.* 131, 323-9.
34. Sanal, E, Ardic F, Kirac S. 2012. Effects of aerobic or combined aerobic resistance exercise on body composition in overweight and obese adults: gender differences. a randomized intervention study. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 8.
35. Santos, A.P., Marinho, D.A., Costa, A.M., Izquierdo, M., Marques, M.C. 2012. The effects of concurrent resistance and endurance training follow a detraining period in elementary school students. *J. Strength. Cond. Res.* 26, 1708-16.
36. Soares, A.M.C., Ribeiro, C., de Araújo, G.G., de Araújo, M.B., Manchado, G.F., Voltarelli, F.A., de Oliveira, C.A., Luciano, E., de Mello, M.A. 2008. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. *BMC Endocr. Disord.* 2. 8:11.
37. Vogler, C.M., Menant, J.C., Sherrington, C., Ogle, S.J., Lord, S.R. 2012 Evidence of Detraining After 12-Week Home-Based Exercise Programs Designed to Reduce Fall-Risk Factors in Older People Recently Discharged From Hospital. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 12.
38. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, Jr. A.W. 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112,1796–1808.
39. World Health Organization: 10 facts on obesity, Feb. 2010 [Accessed on: 27 of Feb. 2010]. Available at <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>.
40. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.

Table**Table 1:****Table 1: Means and standard deviations of glucose values and the area under the glucose curve during the glucose tolerance test.**

Groups	T0	T30	T60	T12	Area under the curve
Control	82±6	99±12	117±8	95±12	12,314±1,122 ^a
Trained	53±6	71±7	77±9	75±6	8,428±853 ^b
Detrained	62±10	79±10	82±16	82±10	9,433±1,200 ^b

Different letters indicate statistically significant differences (one-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$).

Table 2:**Table 2: Mean and standard deviation of glucose values and glucose removal constant (KITT) during the insulin tolerance test.**

Groups	T0	T30	T60	T12	KITT
Control	103±6	85±8	90±11	119±16	0.66±0.18
Trained	102±6	89±10	89±10	92±13	0.62±0.24
Detrained	110±7	99±10	91±23	104±26	0.56±0.26

Note: no statistically significant differences were observed between groups (one-way ANOVA $p < 0.05$).

Table 3:

Table 3: Means and standard deviations of body weights (g) and total lipids (mg/100g) in the adipose tissue from the mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous tissues, at the end of the experiment.

Groups	Body weight	Mesenteric	Retroperitoneal	Subcutaneous
Control	588±71 ^a	4,399±643 ^a	3,191±703	1,896±758
Trained	515±72 ^b	3,007±811 ^b	2,604±1112	1,635±188
Detrained	576±62 ^a	4,085±540 ^a	3,600±858	1,897±385

Different letters indicate statistically significant differences (one-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$).

Table 4: Means and standard deviations of serum glucose (mg/dl), heart, liver and muscle glycogen (mg/100 mg) and glucose uptake by isolated soleus muscles ($\mu\text{mol/g/h}$).

Groups	Serum	Heart	Liver	Muscular	Glucose
	Glucose	Glycogen	Glycogen	Glycogen	Uptake
Control	157±26	0.06±0.01	6.04±0.68	0.48±0.07 ^b	1.96±0.54 ^b
Trained	140±24	0.06±0.01	6.12±0.35	0.66±0.18 ^a	3.28±0.53 ^a
Detrained	154±17	0.07±0.01	6.16±1.00	0.46±0.10 ^b	2.55±0.35 ^a

Different letters indicate statistically significant differences (one-way ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.05$).

7.4 ANEXO 4: ARTIGO PUBLICADO NA LIPIDS IN HEALTH AND DISEASE.



RESEARCH

Open Access

Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats

Ana C Ghezzi*, Lucieli T Cambri, Carla Ribeiro, José D Bottezelli, Maria AR Mello

Abstract

Background: Metabolic syndrome is a disease that today affects millions of people around the world. Therefore, it is of great interest to implement more effective procedures for preventing and treating this disease. In search of a suitable experimental model to study the role of exercise in prevention and treatment of metabolic syndrome, this study examined the metabolic profile and the aerobic capacity of rats kept early in life on a fructose-rich diet, a substrate that has been associated with metabolic syndrome.

Methods: We used adult female Wistar rats fed during pregnancy and lactation with two diets: balanced or fructose-rich 60%. During breastfeeding, the pups were distributed in small (4/mother) or adequate (8/mother) litters. At 90 days of age, they were analyzed with respect to: glucose tolerance, peripheral insulin sensitivity, aerobic capacity and serum glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol, LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations as well as measures of glycogen synthesis and glucose oxidation by the soleus muscle.

Results: It was found that the fructose rich diet led the animals to insulin resistance. The fructose fed rats kept in small litters also showed dyslipidemia, with increased serum concentrations of total cholesterol and triglycerides.

Conclusion: Neither the aerobic capacity nor the glucose oxidation rates by the skeletal muscle were altered by fructose-rich diet, indicating that the animal model evaluated is potentially interesting for the study of the role of exercise in metabolic syndrome.

Background

Clinically, the metabolic syndrome, also known as X syndrome or insulin resistance syndrome comprises a spectrum of disorders in which impaired glucose tolerance represents one of the most important. These changes include insulin resistance, with or without type 2 diabetes mellitus, hypertension, obesity, dyslipidemia, endothelial dysfunction, among others [1].

It is estimated that the prevalence of metabolic syndrome is 24% of the adults and between 50-60% of the population over 60 years in the United States. In 2002, only in this country, according to estimations, there were more than 47 million people with manifestations of this syndrome [2].

The identification of the metabolic syndrome is controversial because there is no single international criterion with the definitive description. Reaven [3] suggested a strong association between individuals with the same

cardiovascular risk factors and designated "X syndrome". Their common denominator was represented by insulin resistance. At the time he, proposed five consequences, all at high risk for cardiovascular disease: glucose intolerance, hyperinsulinemia, increased serum triglycerides, decreased serum HDL cholesterol and hypertension. Obesity and physical inactivity increase insulin resistance and thus aggravate the syndrome. However, this syndrome can be found in healthy individuals, with body weight and normal glucose tolerance [4].

According to Duncan & Schmidt [5], metabolic syndrome is characterized by a cluster of risk factors for cardiovascular disease and diabetes, usually linked to insulin resistance and central obesity. Recently, the European Association for the Study of Diabetes (EASD), in conjunction with the American Diabetes Association published positions about the metabolic syndrome. According to these associations, the metabolic syndrome, which is regarded as a predictor of cardiovascular disease, is poorly defined, requiring more research to help understanding more adequate procedures for its

* Correspondence: carolghezzi@gmail.com

São Paulo State University - UNESP Department of Physical Education Av. 24-A, 1515 Bela Vista Zip code: 13506-900 Rio Claro - São Paulo- Brazil



© 2011 Ghezzi et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

treatment [6,7]. Also according to these associations, the metabolic syndrome is generally defined by the presence of three or more of the following characteristics: high waist circumference, increased blood concentrations of triglycerides, high blood pressure, low circulating HDL cholesterol and high blood glucose concentrations [6,7].

The World Health Organization (WHO) offers a slightly different definition, including anyone who has diabetes or insulin resistance and two of the following characteristics: high waist-hip ratio, high serum concentrations of triglycerides or low serum HDL cholesterol concentration, high blood pressure and high urinary albumin excretion [8]. According to Gale [6] and Kahn [7], taken individually, each of the aforementioned conditions is considered as a risk factor for cardiovascular disease and should be treated as such. All together, these observations show the urgency to expand the studies on the metabolic syndrome.

There are clinical and epidemiological evidence suggesting an association between the progressive development of metabolic syndrome and high consumption of fructose [9]. Indeed, a significant increase in the prevalence of obesity and metabolic syndrome has been linked to a 30% increase in total intake of fructose in the last 20 years in the United States. This has been coupled with the introduction of corn syrups and sweeteners in soft drinks and other foods with high amounts of fructose [10].

Moderate hypertension, glucose intolerance, insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, which are signs of metabolic syndrome, were induced in rats by prolonged feeding with high-fructose diets [11,12]. Therefore, rats fed with this type of diet have been widely used as an experimental model of human metabolic syndrome [13-15]. However, there are studies showing that in the absence of other dietary manipulations, fructose-fed rats do not develop the complete picture of the disease [12]. Also, there are still discrepancies in the literature regarding the changes in glucose homeostasis by administration of fructose-rich diets. Some studies state that these changes occur [16-19], but others do not confirm [20-22]. Therefore the study of the factors that characterize fructose-induced metabolic syndrome in rodents deserve more attention.

It is also known that poor nutrition *in utero* can "program" the fetal tissues in order to make them more vulnerable to food-related disorders such as type 2 diabetes, metabolic syndrome and chronic degenerative diseases in adulthood [23]. Considering that studies using animals maintained on fructose-rich diets as an experimental model of metabolic syndrome, administer the diet after birth, at different periods of life, is of interest to determine the metabolic effects of high fructose doses consumed *in utero*.

Moreover, it was shown that the amount of food consumed during breast feeding has an important role in determining the feeding behavior in adulthood. In a study with rats kept during lactation in litters of 4, 13, 17 or 22 pups per mother, the litter size was inversely associated with dietary intake in adulthood [24]. According to the authors, this shows that the control of food intake of newborn rats permits "programming" of food intake later in life. Therefore, it is also of interest to manipulate the amount of food offered to the neonate animal undergoing treatment with fructose.

In the treatment of metabolic syndrome, exercise has been considered of great importance [25]. Such an intervention demonstrated to improve glucose tolerance and to attenuate insulin resistance. Since there are limitations in human research, animal models offer more suitable conditions to study the issue. Therefore, it seems of importance to verify if the feeding protocols imposed to rats early in life interfere with the ability to perform physical exercise in adulthood.

In search of a suitable experimental model to study the role of exercise in the treatment of metabolic syndrome, this study examined the metabolic profile as well as glucose uptake by skeletal muscle and aerobic capacity of rats maintained on a fructose-rich diet during intrauterine and postnatal life.

Materials and methods

Animals and treatment

Adult pregnant Wistar (90 days) rats, fed during pregnancy and lactation with two diets: balanced (AIN-93G) or fructose-rich (60% fructose) were used. During breastfeeding, the pups were distributed in small (4/mother) or adequate (8/mother) litters. After weaning, they were kept in the same diets until 90 days. All animals had body weight and length (nose to anus) and food intake recorded once a week from weaning (21 days) on. All procedures used with animals were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation/CEEA, Campinas State University (UNICAMP), under the Protocol 1487-1.

Diet treatment

During the experiment, food consisted of balanced or fructose-rich semi-purified diets, as described in Table 1.

Experimental Groups

1. Control (C): rats maintained on the balanced diet in intrauterine and postnatal life, nursed in appropriate litters (n = 7);
2. Control/Small litter (CS) rats maintained on the balanced diet in intrauterine and postnatal, nursed in small litters (n = 7);

Table 1 Diet treatment

Components (g/kg)	Balanced ¹	Fructose-rich (60%)
Casein	202	202
Corn Starch	397	-
Dextrin	130.5	-
Sucrose	100	276
Fructose	-	600
L-cystine	3	3
Soybean oil	70	70
Mineral mix (AIN-93GMX) ¹	35	35
Vitamin mix (AIN-93GVX) ¹	10	10
Fiber	50	50
Choline chloride	2.5	2.5

1. According to the Reeves [26].

3. Fructose (F) rats maintained on the high-fructose diet in intrauterine and postnatal life, nursed in appropriate litters (n = 7);

4. Fructose/Small litter (FS) rats maintained on the high-fructose diet in intrauterine and postnatal life, nursed in small litters (n = 7);

Glucose tolerance test - GTT

This test was performed with the animals at the end of the experiment, after 12 hours of fasting. A first blood sampling was performed through a small cut on the tip of the tail (time 0). Afterwards, an 80% glucose solution (2 g/kg of weight) was administered to the rats through a polyethylene gastric probe. Blood samples were collected after 30, 60 and 120 minutes with heparinized capillaries and calibrated to 25 μ L, for of glucose and insulin determinations. The blood glucose concentrations were determined by the glucose oxidase-peroxidase enzymatic colorimetric method using commercial kits (LABORLAB®) and the blood insulin concentrations by ELISA, also employing commercial kits (SIGMA®). The area under the serum glucose curve during the test were evaluated using the trapezoidal method (AG = mg*120 min) with ORIGIN PRO 8 software.

Insulin tolerance test - ITT

Insulin sensitivity was evaluated by the insulin tolerance test. The test consisted of a bolus injection of insulin (300 mU/kg body weight) followed by blood sample collections, for the measurement of glucose concentrations, from a cut at the tip of the tail before and 30, 60 and 120 minutes after the insulin injection. The serum glucose disappearance rate (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$ where $t_{1/2}$ is the half-life of the process. The serum glucose half-life was calculated from the slope of a least-square analysis of serum glucose concentrations from 0 to 60 minutes after the

subcutaneous injection of insulin, during this time, the glucose reduces linearly [27].

Maximal Lactate Steady State - MLSS

The identification of the aerobic/anaerobic metabolic transition during swimming was performed using the MLSS protocol. The first swimming test was started 48 hours after the completion of the ITT. In short, the animals were submitted to four swimming tests of increasingly intensities in which they supported constant workloads relative to body weight in each test. These tests were given at intervals of forty eight hours until the stabilization of blood lactate concentrations during exercise was no longer possible. Each test consisted of thirty minutes of continuous swimming supporting the chosen workload, with blood collection by a small cut at the tip of the tail every five minutes to determine the concentrations of lactate. The blood lactate concentrations were then determined by a spectrophotometer [28]. The criterion used for stabilization was a difference less than or equal to 1.0 mM of blood lactate between the 10th and 25th minutes of exercise [29].

Blood and Tissue sample collection

At the end of the experiment, the animals were killed by decapitation, 48 hours after the last *in vivo* evaluation, at rest, the blood being collected for the determination of serum concentrations of glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol by colorimetric methods, using commercial kits (LABORLAB®) and of insulin by ELISA, also using commercial kits (SIGMA®).

The adipose tissue of the posterior subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal regions were removed and weighed for determination of total lipids content. Excision of the different fat deposits was carried out according to the description of Cinti [30]. The total lipid concentrations were determined by the procedure described by Nogueira [31].

For the assessment of glucose metabolism, soleus muscle longitudinal strips weighing 25 - 35 mg (wet weight) were first incubated for 30 min at 37°C in a Dubinoff water bath, inside glass scintillation vials containing 1.5 mL of a Krebs bicarbonate buffer (NaCl 0.6%; HEPES 6.64 mM; KCl 0.032%; CaCl₂ 1.14 mM; KH₂PO₄ 0.015%; NaHCO₃ 0.19%; MgSO₄ 0.03%) equilibrated with a mixture of 95%O₂-5%CO₂, pH 7.4. After this, the muscle strips were transferred to new glass scintillation vials (outer vials) containing 1.5 mL of Krebs-bicarbonate buffer supplemented with glucose 5.5 mM, containing [U-¹⁴C]glucose (0.25 mCi/mL) and [3H +] 2-deoxyglucose (2DG, 0.5 μ Ci/mL) and insulin (100 μ U/mL). Inside these scintillation vials, other glass vials (inner vials), which were formed like a scoop with an

upwards-directed straight shaft, containing 700 mL of hyamine 10-x were installed. The shafts of the inner vials were squeezed about 1 cm through a small hole in a round rubber membrane. The outer vials were sealed with the rubber membrane and laced with plastic rings. This system, containing the muscle strips, was incubated in the Dubinoff water bath for 60 min. The release of CO_2 was stimulated by the injection of 200 μL of trichloroacetic acid 25% into the outer vials and the CO_2 was trapped in hyamine 10-x during a further 3 h incubation at 37°C . Glucose incorporation to glycogen (glycogen synthesis) was determined by measuring the radioactivity of the ^{14}C in the precipitated obtained during muscle glycogen extraction process [32]. Glucose oxidation was estimated by the measurement of the radioactivity of the ^{14}C in the inner vial liquid. Glucose (2DG) uptake was evaluated in the alkaline phase obtained during muscle glycogen extraction process, by measuring the radioactivity of the 3H^+ . All measurements of radioactivity were carried out in a PACKARD Tricarb 2100 scintillation counter, in a TRITON X-100 toluene-based scintillant.

Statistics

The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and, when necessary, by post hoc Newman-Keuls. In all cases, the level of significance was set at 5%. The software used for the analysis was Statistica 7.0.

Results

Figure 1 (A) reveal the evolution of animals' body weight throughout the experiment. Data analysis

was performed by the area under the curve of body weight (B). The groups fed with the fructose-rich diet (F and FS) had lower body weight than controls, with the lowest values given by the group kept in appropriate litters during lactation (F).

Figure 2: Presents the results of the nose-to-anus length of the animals (A). Data analysis was performed by the area under the curve of nose-to-anus length (B). No significant difference was found between the groups.

Figure 3 shows the food intake per 100 g of body weight and per day of the animals during the experiment (A). Data analysis was performed by the area under the curve of food intake (B) of the animals. No significant difference was found between the groups.

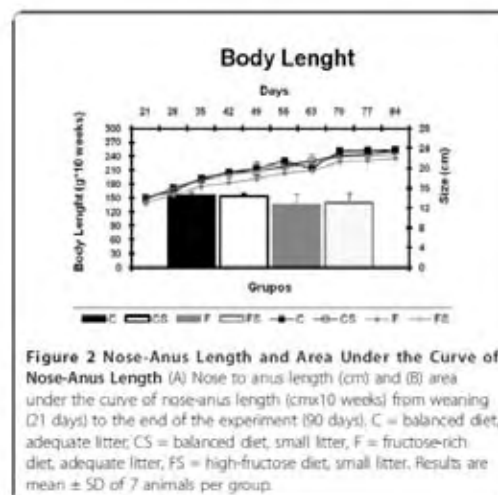
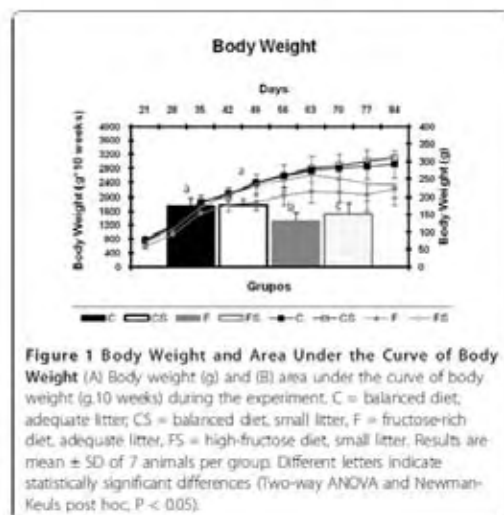
Figure 4 contains the blood glucose concentrations data (A) and area under blood glucose curve (B) during the glucose tolerance test (GTT). No significant difference was found between the groups.

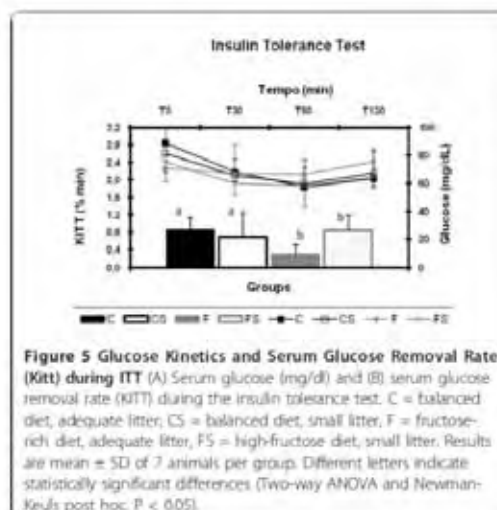
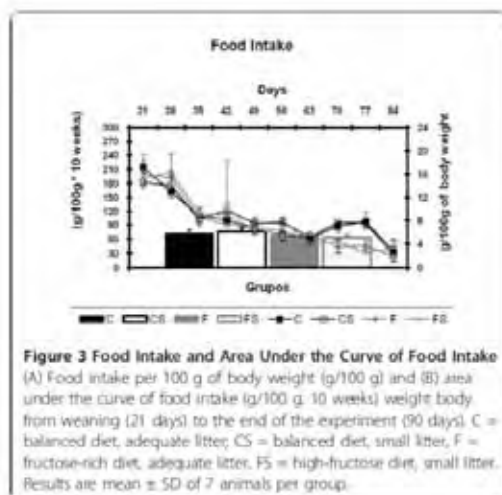
Figure 5 displays the blood glucose (A) and the blood glucose removal rate (KITT) (B) during insulin tolerance test. The F group showed significantly lower values of KITT than the others, indicating insulin resistance.

Figure 6 shows the mean load (A) and the mean blood lactate concentration corresponding to maximal lactate steady state (B) for the different groups. There was no statistical difference between the groups.

In the Figure 7 the values of adipose tissue weight for the mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous regions are presented, while Figure 8 reveals the values for fat content in the same adipose tissue deposits. No significant difference between the groups was found.

The serum parameters for the groups at the end of the experiment are presented in Table 2. There were no





significant differences in glucose and LDL cholesterol values between the groups but for total cholesterol it can be observed that the FS group showed statistically higher values than C and CS groups. It was observed that the F and FS groups showed significantly higher triglycerides concentrations than the C group. It was also observed significantly higher values of HDL in the groups fed the fructose-rich diet than in C group.

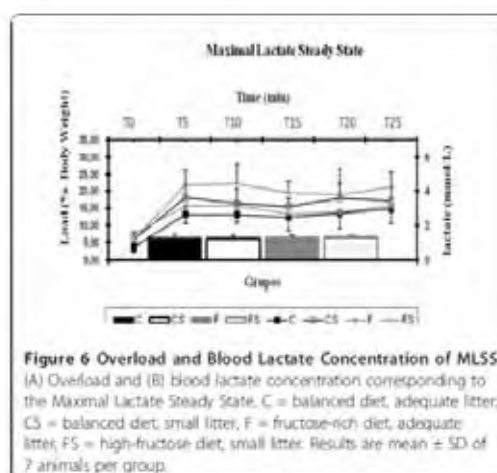
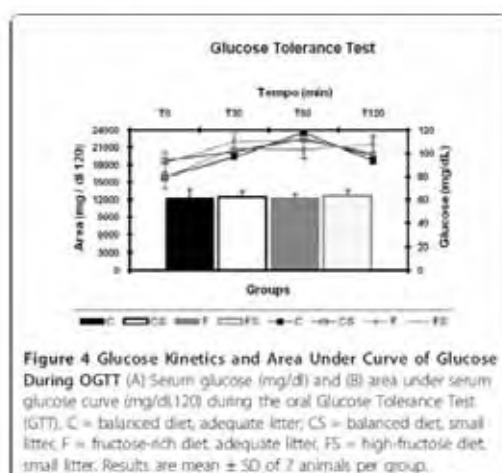
There were no significant differences in glucose and LDL cholesterol values between the groups but for total cholesterol it can be observed that the FS group showed statistically higher values than C and CS groups. It was observed that the F and FS groups showed significantly

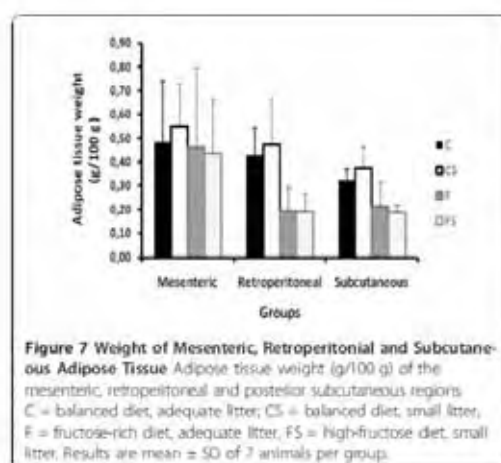
higher triglycerides concentrations than the C group. It was also observed significantly higher values of HDL in the groups fed the fructose-rich diet than in C group.

In Table 3 no significant difference was found in glycogen synthesis, glucose uptake and glucose oxidation rates by the isolated soleus muscle between rats fed the fructose-rich diet and those fed the control.

Discussion

This study analyzed the effects of fructose and of the amount of food during the fetal and post natal periods on the metabolic profile and on the aerobic capacity of





rats in adulthood. Much of the knowledge we have today about the etiology of metabolic syndrome refers to studies in experimental models, but few studies were successful in developing all the metabolic changes that characterize this syndrome in animals. Some studies use genetically modified animals, which show isolated changes as dyslipidemia, hypertension and obesity [33]. Fructose-rich diet has been used in several studies to develop the signs of the metabolic syndrome for further studies of this disease that has affected millions of people around the world [11,12].

Increased amounts of fructose (group F) and/or food (groups FS and CS) administered during the fetal and

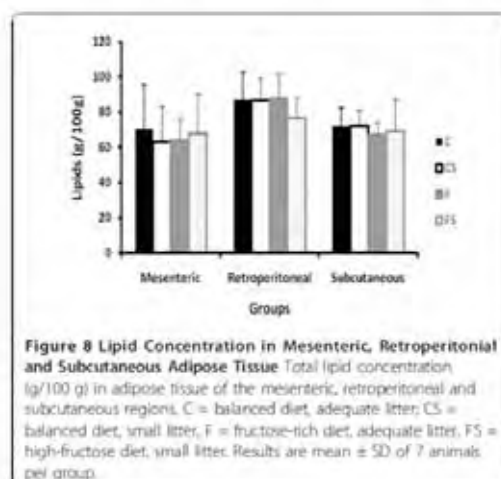


Table 2 Serum glucose (mg/dl), total cholesterol (mg/dl), HDL (mg/dl), LDL (mg/dl) e triglycerides (mg/dl) at 90 days

Parameters	Groups			
	C	CS	F	FS
Glucose	85 $\pm$ 14	106 $\pm$ 28	117 $\pm$ 47	114 $\pm$ 31
Total Cholesterol	53 $\pm$ 2 ^a	59 $\pm$ 7 ^a	69 $\pm$ 21 ^{ab}	80 $\pm$ 22 ^b
HDL Cholesterol	24 $\pm$ 5 ^a	31 $\pm$ 8 ^{ab}	36 $\pm$ 8 ^b	39 $\pm$ 15 ^b
LDL Cholesterol	34 $\pm$ 5	38 $\pm$ 4	33 $\pm$ 5	37 $\pm$ 5
Triglycerides	42 $\pm$ 10 ^a	78 $\pm$ 33 ^{ab}	118 $\pm$ 66 ^b	120 $\pm$ 39 ^b

Results expressed as mean $\pm$ SD of 7 animals per group. Different letters indicate significantly different values. C = balanced diet, adequate litter; CS = balanced diet, small litter; F = fructose-rich diet, adequate litter; FS = high-fructose diet, small litter. Different letters indicate statistically significant differences (Two-way ANOVA and Newman-Keuls post hoc, $P < 0.05$).

postnatal periods did not change food intake of the animals when compared to controls (group C). Similar findings were reported by Moura [34]. These authors found that early administration (after weaning) of high amounts of fructose in drinking water or food did not alter food intake of rats. Increased amounts of fructose and/or food during fetal and postnatal periods did not affect the linear growth of the animals. These results also are consistent with those of Choi [35] observed in animals fed fructose after weaning.

The FS group showed weight loss when compared with C and CS groups and this loss was even greater in the F group that ingested fructose and was kept in proper litters. On the other hand, Kelley [17] and Bezerra [12] found no difference in body weight of animals fed with fructose, but these studies differ from the present study, since here the administration of fructose was made during the fetal/neonatal life, an extremely important stage for growth and development.

One aspect that deserves attention is that, at the moment of sacrifice, it was observed that the stomach and intestines of some animals fed the fructose-rich diet appeared dilated, apparently containing large amounts of gases. Symptoms such as increased diameter of the abdominal area and abdominal pain are signals present in fructose intolerance [35]. It was reported that under normal conditions, in the prenatal and suckling periods

Table 3 Glucose oxidation, glucose uptake and glycogen synthesis by isolated soleus muscle of rats at 90 days (umol/g.60 min)

Parameters	Groups			
	C	CS	F	FS
Glucose Oxidation	4.91 $\pm$ 1.2	4.93 $\pm$ 1.3	5.2 $\pm$ 1.7	4.5 $\pm$ 0.9
Glucose Uptake	24.4 $\pm$ 12.3	23.2 $\pm$ 10.0	22.7 $\pm$ 8.0	23.0 $\pm$ 9.8
Glycogen Synthesis	0.8 $\pm$ 0.2	0.88 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.2

Results expressed as mean $\pm$ SD of 7 animals per group. C = balanced diet, adequate litter; CS = balanced diet, small litter; F = fructose-rich diet, adequate litter; FS = high-fructose diet, small litter.

of rat development, intestinal GLUT5 (the fructose transporter at the apical cell membrane) mRNA levels and fructose transport rates are very low [36]. Therefore, the administration of large amounts of fructose during the fetal/neonatal period may lead to intolerance to the substrate, which may impair body weight gain.

The glucose tolerance of the animals was not altered by the excessive intake of fructose. However, insulin sensitivity decreased in the group fed the fructose-rich diet and maintained in proper litters (F group) during lactation. This contrasts with the study by Moura et al. [34], in which a fructose-rich diet, administered after weaning, made the animals intolerant to glucose without changing insulin sensitivity. Moreover, similar to what occurred in the present study, Bezerra [12] found insulin resistance, determined by the KITT during an insulin tolerance test.

The aerobic capacity of the animals determined by the maximal lactate steady state protocol was not affected by the ingestion of fructose, because there was no statistical difference between the animals fed fructose and balanced diet neither in the work load nor in the blood lactate concentration at the MLSS intensity during swimming exercise, in accordance with previous studies using young (weaned) rats subjected to high fructose diets [37]. Therefore, the fructose-rich diet does not impair the ability to perform aerobic exercises. This was further reinforced by the fact that, in the skeletal muscle, neither glucose oxidation nor glucose uptake and glycogen synthesis rates were also affected by the fructose-rich diet early administration.

The accumulation of adipose tissue in the mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous regions was not affected by the fructose-rich diet. In studies with Sprague-Dawley adult rats receiving a fructose solution combined with standard diet, there was a higher body weight gain and weight of fat tissues than in the control group fed only the standard diet [38]. Therefore, an important factor, when dealing obesity/metabolic syndrome in experimental rat models, is the animal strain, as there are animals that are more susceptible to certain metabolic disorders than others.

The effects of dietary fructose on lipoprotein metabolism is an important issue, and the effects of dietary fructose on circulating triglyceride and on circulating total cholesterol as well as on HDL and LDL cholesterol become crucial in the evaluation of the metabolic impact of fructose. Serum concentrations of total cholesterol in the present study were significantly higher in the group that ate the fructose-rich diet and was kept in small litters (FS) compared to C group. Triglyceride concentrations showed to be increased in groups fed the fructose-rich diet (F and FS) when compared with C group. In the group fed the high- fructose diet and

maintained in small litters (FS), the increase was even more pronounced. Several studies have also observed an increase in circulating triglyceride concentrations in rats subjected to elevated fructose intake, regardless time of life the diet was imposed [17,12]. Serum HDL concentrations were significantly elevated in the groups fed the fructose-rich diet (F and FS) when compared to controls. Similar feature was reported previously by Moz and colleagues [39] in adult Sprague-Dawley rats fed with various levels of fructose.

Studies have shown that one of the factors that often lead to insulin resistance is the excess of circulating non-esterified fatty acid (NEFA), which may be derived from the triglyceride-rich lipoproteins LDL and VLDL or from the adipose tissue. Because the anti-lipolytic action and the stimulation of lipoprotein lipase by insulin, resistance to this hormone contributes to the increase in lipolysis and in serum NEFA concentrations. NEFA acts in the liver in order to increase glucose and triglycerides synthesis and induces the increase of circulating LDL [40]. This would explain, at least in part, the origin of the insulin resistance and of the increased serum cholesterol and triglycerides in the present study in the rats that ingested fructose. Unfortunately, serum NEFA concentrations were not measured in the present study.

Conclusion

In summary, feeding the fructose-rich diet during the intrauterine and the postnatal periods led to insulin resistance. When associated to increased food intake, feeding the fructose rich diet induced dyslipidemia, with increased serum concentrations of total cholesterol and triglycerides. Fructose rich diet intake did not impair either the aerobic capacity or the glucose oxidation by the skeletal muscle in the conditions of the present study. Taken together, these results show that the animal model evaluated is potentially interesting for the study the role of exercise in the metabolic syndrome.

List of abbreviations

GTT: Oral Glucose Tolerance Test; HDL: High Density Lipoprotein; ITT: Insulin Tolerance Test; KITT: Serum Glucose Disappearance Rate; LDL: Low Density Lipoprotein; MLSS: Maximal lactate steady state; NEFA: Non-Esterified Fatty Acid; TG: Triglycerides; VLDL: Very Low Density Lipoproteins; WHO: World Health Organization.

Acknowledgements

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio and José Roberto R. Silva for technical assistance. Cornstarch and dextrin for the diets were provided by Corn Products Brasil Ingredientes. This research was supported by the Brazilian foundations FAPESP, CNPq and CAPES.

Authors' contributions

ACG was responsible for the experimental design, data collection, statistical analysis and preparation of the manuscript. LTC was responsible for the experimental design and for data collection. CR and JDB were responsible

for the data collection and the preparation of the manuscript. MARM was responsible for experimental design, coordination of research and preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript text.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 November 2010 Accepted: 11 January 2011
Published: 11 January 2011

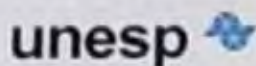
References

- Zechin HQ, Carvalho JRC, Saad MJA: *Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica*. *Rev Soc Cardiol Est de São Paulo* 2004, **14**:574-89.
- Sarrad F, Vysil KT, Westbrook SM, Pandey M, Hossaini SG, Loskutoff DJ: Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci* 1999, **96**:6902-6907.
- Reaven GH: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988, **37**:1595-1607.
- Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G, Bonati PA, Bergonzi M, Gnudi L, Passeri M: Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. *N Engl J Med* 1989, **320**:702-706.
- Duncan BR, Schenck MA: Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *São Paulo Med J* 2001, **119**:122-127.
- Gale EAM: The myth of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2005, **48**:1679-1683.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M: The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. *Diabetologia* 2005, **48**:1684-1699.
- WHO: World Health Organization: WHO consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 1999, 231-33. WHO/NCD/NCS/99.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JL, Teff K, Havel PJ: Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002, **76**:911-922.
- Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ: Hypothesis: fructose induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005, **1**:80-86.
- Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GH: Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987, **10**:512-516.
- Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, Carvalho CRD, Saad MJA, Gonçalo JAR: A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2001, **34**:1155-1160.
- Okada Y, Yoshino T, Takeuchi A, Endoh M, Ohta H, Jinno Y, Yokawa T, Izawa T, Kobayashi E: Effects of the K⁺ Channel Opener KIR4884 on the Cardiovascular Metabolic Syndrome Model in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, **35**:287-293.
- Naga Y, Nishi Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikawa H, Kashiwagi A: Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, **282**:E1180-E1190.
- Oron-Herman M, Rowlands T, Mirelman D, Meiri T, Rubinkov A, Walkchek M, Sela BA: The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2005, **183**:238-243.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AE, Khouri S, Kraegen EW: Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* 1989, **49**:155-163.
- Kelley GL, Allen G, Aubert R: High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology* 2004, **145**:548-555.
- Girard A, Madani S, Boukott F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J: Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 2006, **22**:758-766.
- Shanabli Y, Oron-Herman M, Kanari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamir A: Effect of PPAR γ agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens* 2007, **20**:206-210.
- Jörgens H, Haas W, Castafeda TR, Schürmann A, Kneibick C, Dombrowski F, Otto B, Nawrocki AR, Scherer PE, Spranger J, Ristow M, Jost H, Havel PJ, Tschö M: Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res* 2005, **13**:1146-1156.
- Pogliani R, Vila L, Farré M, Alegrí M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC: Impairment of hepatic stat-3 activation and reduction of PPAR γ activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007, **45**:779-788.
- Sánchez-Lazada LG, Tapia E, Jimeñez A, Bautista F, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Villa-Casido C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M: Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Ren Physiol* 2007, **292**:F423-F429.
- Hales CN, Barker DJP: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992, **35**:595-601.
- Oliva LB, McGarr JA: Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1978, **235**:R141-R144.
- Ciolac BG, Guimarães GR: Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte* 2004, **4**:319-324.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993, **123**:1939-1951.
- Lundbaek K: Intravenous glucose tolerance test as tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Brit Med J* 1962, **3**:1057-1063.
- Engel WC, James JL: Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal Biochem* 1978, **88**:475-484.
- Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E: Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol* 2001, **130A**:21-27.
- Cinti S: The adipose organ. *Prostaglandin Leukotriene Essent Fatty Acids* 2005, **73**:9-15.
- Nogueira DM, Struhal B, Hirata MH, Abdalla DSP, Hirata HOC: Sangue-partes e Glicídios. *Metod de Bioquímica Clínica* 1990, **153**:168.
- Sjogren B, Nordenskjöld OT, Holmgren H, Wollstenstrom Z: Beitrag zur Kenntnis des leberfunktions. *Pflüger Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1938, **240**:247.
- Altman TJ, Glazer AM, Wallace CA, Cooper LD, Norworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Thorsblom PM, Mann CJ, Shoultens CC, Graf DT, Lenzon E, Kurta TW, Kien V, Pravenec M, Ibrahim A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J: Identification of C636 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Gen* 1999, **21**:61-62.
- Moura RF, Ribeiro C, De Oliveira JA, Stevanato E, Mello MAR: Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr* 2008, **101**:1-7.
- Choi YK, Johnson JRF, Summers RW, Jackson M, Rao SSC: Fructose intolerance: an under-recognized problem. *Am J Gastroenterol* 2003, **98**:1348-1353.
- Douard V, Fehriat RP: Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, **295**:E227-E237.
- Moura RF, Cambal LT, Quadros AC Jr, Nascimento CMC, Azeites LM, Sebastião E, Tanaka K, Papini CB, Oliari MM, Mota CSA, Ribeiro C, Mello MAR: Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. *Rev Bras Med Exp* 2008, **14**:22-26.
- Kanarek RB, O'Brien-Gambill N: Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr* 1982, **112**:1546-1554.
- Moz B, Alcantara C, Roca R, Ambrose M, Mosley K, Kern M: Effects of various levels of dietary fructose on blood lipids of rats. *Nutr Res* 2004, **24**:565-571.
- Machado UF, Schaen BD, Scaphim PM: Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arg Bras Endocrinol Metab* 2006, **50**:177-189.

doi:10.1186/1476-511X-10-3

Cite this article as: Ghezzi et al.: Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. *Lipids in Health and Disease* 2011 **10**:3

7.5.ANEXO 5: COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 016/2010

Instituição: UNESP - IB - CRC	Departamento: Educação Física
Protocolo nº: 2638	Registro CEUA: 07.04.2010
Projeto de Pesquisa: "Marcadores da Síndrome Metabólica e da Capacidade Aeróbia de ratos (<i>Rattus Norvegicus albinus</i> , Wistar) em diferentes idades"	

Pesquisador Responsável: Maria Alice Rostom de Mello

Orientando(a): Ana Carolina Ghezzi

Colaboradores: Clarice Yoshiko Sibuya; Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues da Silva

Objetivo Acadêmico:	() TCC
	() Mestrado
	() Doutorado
	(x) Outros (especificar) – Iniciação Científica

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Rio Claro, em sua 5ª reunião ordinária, realizada em 17/08/2010.

(x)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou, devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 20 de agosto de 2010

Prof. Dr. Celso Fernando Baptista Haddad
Coordenador do CEUA