

Rafael Junges Moreira

**EFEITO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E DE PROGRAMA DE TREINAMENTO E
DESTREINAMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS
NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE
RATOS**

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

2013

Rafael Junges Moreira

**EFEITO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E DE PROGRAMA DE TREINAMENTO E
DESTREINAMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS
NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE
RATOS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Monteiro Seraphim

FISIOTERAPIA

FICHA CATALOGRÁFICA

M839e Moreira, Rafael Junges.
Efeito de dieta hiperlipídica e de programa de treinamento e destreinamento sobre a expressão de proteínas envolvidas na captação de glicose em musculatura esquelética de ratos / Rafael Junges Moreira Nome por extenso. - Presidente Prudente: [s.n], 2013
86 f.

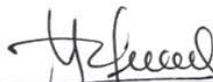
Orientador: Patrícia Monteiro Seraphim
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

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

BANCA EXAMINADORA



PROFA. DRA. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM
(ORIENTADORA)



PROFA. DRA. MARIA TEREZA NUNES
(USP)



PROFA. DRA. RENATA CALCIOLARI ROSSI E SILVA
(UNOESTE)



RAFAEL JUNGES MOREIRA

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 18 DE NOVEMBRO DE 2013.

RESULTADO: Aprovado

SUMÁRIO

SUMÁRIO	
DEDICATÓRIA	1
AGRADECIMENTOS	2
EPIGRAFE	3
APRESENTAÇÃO	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO	9
ARTIGO 1	17
Resumo	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Materiais e Métodos	23
Análise Estatística.....	27
Resultados.....	27
Discussão	29
Referências.....	34
Anexos	38
Tabelas.....	38
Figuras.....	40
Legenda das tabelas	43
Legenda das figuras	44
ARTIGO 2	45
Resumo	47
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Materiais e Métodos	50
Resultados.....	54
Discussão	57
Referencias.....	60
Anexos	66
Tabelas.....	66
Figuras.....	67
Legenda das tabelas	69
Legenda das figuras	70
REFERÊNCIAS.....	71

DEDICATÓRIA

“Ao meu pai, meu herói, **Luis Norberto Christovam Moreira**, que durante todos esses anos me apoiou incondicionalmente e que sempre iluminou minha vida com afeto e dedicação para que eu nunca parasse de caminhar. A você que se doa por inteiro e renuncia á seus sonhos, para que muitas vezes eu possa realizar os meus, não bastaria um muito obrigado. A você, pai, bastaria dizer que não existem palavras para agradecer tudo isso.”

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”
William Shakespeare

Gostaria de deixar registrado o meu agradecimento àqueles que me apoiaram e colaboraram e, de alguma maneira, foram importantes nessa fase da minha jornada:

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família, e minha mãe, sempre um exemplo de garra e perseverança, Diante das maiores rasteiras da vida sempre continuou em frente, uma verdadeira guerreira, obrigado por ser minha mãe;

A meu pai Luís e minha madrasta Rosemeire, que me apoiaram desde o início desta jornada, em 2007, sempre estiveram ao meu lado, fazendo o possível e o impossível quando o mundo parecia ruir, companheiros de horas boas e ruins e que sempre me levantaram quando era mais fácil deixar caído, quero de deixar registrado que vocês são em quem me espelho. Tudo só foi possível graças a vocês;

A minha orientadora, Dr. Patricia Monteiro Seraphim, primeiramente pelo seu voto de confiança ao me franquear seu laboratório desde 2009, pela sua cumplicidade, amizade, e pela sua paciência em algumas horas, afinal orientar um aluno muito “teimoso” realmente não deve ser fácil. Companheira de churrascos e também “puxões de orelha”, mas com que sempre pude contar em horas boas ou ruins, espero cultivar nosso vínculo durante muito tempo para que sempre troquemos histórias e pérolas;

A futura Dra. Ana Carolina Panvelosk Costa, pela ajuda, amizade, e maneira especial de ser, sem você este trabalho não teria sido realizado, pessoa muito querida, sempre me auxiliando desde a época de minha graduação, como minha co-orientadora, com você aprendi que a humildade é uma qualidade em extinção,

essencial aonde quer que estejamos, e que sempre temos algo a aprender e ensinar;

Aos amigos presentes durante a jornada Lucas Zarpelon, Thiago Pereira, Lucas Manea, Gabriel Tufolo, Gabriéla Igreja, Júlio Cesar, Edward Lammers, Raul Barreto, obrigado pelos churrascos e risadas que compartilhamos juntos;

Aos amigos membros do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFIS) Patricia Ebersbach, Patricia Gomes, Ana Carolina, Bruna Brasil, Danilo Antonio, Leidiane Santos, Rogério Batista, Lucas Agostini, Armando Ribeiro, Laís Regina, Carol Rippi, Tamara Gouveia, Thais Dutra, e aos agregados, Fabiana Araújo, Carolina Cabral, meu muito obrigado pela ótima convivência, risos e brincadeiras;

A minha primeira orientada Laís Regina Rossi, uma pessoa muito especial e com um coração do tamanho de sua força de vontade, com você eu aprendi que ensinar alguém não é apenas compartilhar seu conhecimento, também alegrias e tristezas, meu muito obrigado de todo o coração;

Ao professor Zeca e Luís Carlos pela disponibilização do biotério de experimentação animal e, professores Ubiratan Fabres Machado e Maria Tereza Nunes pela disponibilização de seus laboratórios para a realização de parte deste trabalho;

A vocês todos, muito obrigado!

EPÍGRAFE

“É difícil dizer o que é impossível...
porque o sonho de ontem
é a esperança de hoje,
e a realidade do Amanhã.”
(Robert Goddard)

APRESENTAÇÃO

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

Artigo1

“Treinamento intermitente de alta intensidade previne resistência insulina e inflamação muscular em ratos obesos, induzidos por dieta mesmo após período de destreinamento”.

Rafael Junges Moreira, Lucas Agostini, Armando Florido Ribeiro Neto, Patricia Monteiro Seraphim, Ana Carolina Panveloski Costa, Maria Tereza Nunes.

Submetido á apreciação, visando publicação na Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia (ABEM).

Artigo2

“Alterações provocadas pelo treinamento perduram após 9 semanas de destreinamento”

Rafael Junges Moreira (1), Lucas Agostini (1), Armando Florido Ribeiro Neto (1), Ubiratan Fabres Machado (2), Patricia Monteiro Seraphim (1).

Submetido a apreciação, visando à sua publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte (RBME).

RESUMO

Introdução: Os mecanismos de instalação e desenvolvimento dos quadros de sobrepeso e obesidade e aspectos relacionados à prevenção têm sido bastante investigados, porém muitas perguntas ainda precisam de respostas. **Objetivos:** Avaliar o efeito de um programa de treinamento e destreinamento de nove semanas associado a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica sobre a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, junto com a expressão de GLUT4 e TNF- α , e conteúdo de RNAm de *Slc2a4*, *Tnf*, *Pgc1a* no tecido muscular.

Metodologia: Ratos Wistar de 3 meses de idade distribuídos em 8 grupos: C- controle sedentário; O- obeso sedentário; CE- controle exercício; CD- controle exercício destreinado; OE- obeso exercício; OD- obeso exercício destreinado. Os grupos C e O foram divididos em 2 subgrupos: C e O sacrificados aos 5 meses de idade, C7 e O7 aos 7 meses de idade. Os animais controles receberam dieta padrão e os grupos obesos seguiram uma dieta hiperlipídica. Simultaneamente à dieta, o treinamento foi realizado 3 vezes por semana, durante 9 semanas; posteriormente, os grupos destreinados ficaram mais 9 semanas sem realizar exercício físico. Para a avaliação do grau de resistência à insulina, foi realizado um teste de tolerância à insulina, e um teste de tolerância a glicose. A avaliação estatística dos resultados foi feita através da comparação das médias, utilizando o Teste ANOVA, paramétrico, com pós-teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de P for menor que 0,05. **Resultados:** Os animais obesos apresentaram peso, adiposidade periepididimal e índice de massa corpórea superior aos animais controle, mostrando que a dieta empregada induziu a obesidade nestes grupos. Os animais O e O7 apresentaram menor sensibilidade insulínica que os demais,

bem como intolerância à glicose em ambas as fases do estudo, nos obesos quando analisado o exercício, evitou-se esse quadro. Quando avaliado a expressão dos genes *Slc2a4*, *Tnf*, *Pgc1a*, notou-se elevação do conteúdo de RNAm de *Tnf* e redução do *Pgc1a* nos grupos O e O7, quando comparado aos animais submetidos ao treinamento (CE CD, OE). A expressão proteica de TNF- α só foi significativamente aumentada no grupo O, o treinamento foi eficaz em evitar o aumento enquanto o treinamento estava ativo (CE, OE). Portanto conclui-se que a dieta hiperlipídica causou malefícios provenientes de um quadro de obesidade bem instalado e de resistência à insulina e o exercício foi eficaz em prevenir alguns destes males, mesmo após 9 semanas do sobrestar da atividade.

Palavras Chave: Exercício Físico; Destreinamento; Sensibilidade à insulina; Dieta hiperlipídica; TNF- α ; GLUT4

ABSTRACT

Introduction: The mechanisms of installation and development of overweight and obesity as well as prevention have been extensively investigated, but many questions still need answers. **Objectives:** To evaluate the effect of a training program for nine weeks and detraining on insulin sensitivity and glucose tolerance will, along with the expression of GLUT4 and TNF- α mRNA content and Slc2a4, Tnf, Pgc1a in muscle tissue situations training / detraining. **Methods:** Wistar rats of 3 months of age divided into 8 groups: control - C, O- obese, CE - control exercise, CD control detraining; OE - obese exercise, OD obese detraining. The group C and O were divided into 2 subgroups C and O, C7 and O7. Control animals received a standard diet and obese groups followed a high fat diet. Simultaneously with diet the training was conducted 3 times a week for nine weeks later, detraining groups were 9 weeks more, without doing exercise. To evaluate the insulin resistance, a test was performed insulin tolerance teste "in vivo", and glucose tolerance test. Statistical evaluation of results was done by comparison of means using parametric test ANOVA, with post- test of Tukey. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$. **Results:** obese animals showed higher adiposity and body mass index than the control animals, showing that diet induced obesity employed in these groups. The O e O7 group had lower insulin sensitivity than the other, as well as higher glucose intolerance in both phases of the study, when analyzing the exercise in obese avoided this situation. When considered the expression of genes Slc2a4, Tnf, Pgc1a, we noted high content of Tnf mRNA and reduced Pgc1a in O and O7 groups, when compared to animals submitted to training (CD CE, OE). Protein of TNF- α expression has be significantly increased only in the O group, the training

was effective in preventing the increase while the training was active (CE, OE). So concludes high fat diet caused damage from a frame and installed obesity and insulin resistance and exercise was effective in preventing all the impariments caused by excess body fat, even after 9 weeks of stop training.

Keywords: Exercise; Detraining; Insulin sensitivity, High Fat Diet, TNF-a; GLUT4.

INTRODUÇÃO

Um relatório global publicado recentemente mostra que a obesidade é um problema de saúde global maior do que a fome. Além disso, é a principal causa de incapacidade em todo o mundo. Segundo o relatório, todos os países, com exceção da África subsaariana, enfrentam taxas de obesidade alarmantes, nas duas últimas décadas ocorreu um aumento de 82% em todo o mundo. Os Países do Oriente Médio estão mais obesos do que nunca, vendo um aumento de 100% desde a década de 90 (LIM, *et al* 2010).

Pesquisas recentes avaliaram as medidas de 188 mil pessoas no Brasil, mostrando que 50,1% dos homens estão com excesso de peso, e entre as mulheres o percentual é de 48%. Fator de risco para a saúde, o problema tem aumentado entre os adultos desde a década de 1970, quando o índice de sobrepeso era de 18,5% para os homens e 28,7% para as mulheres. Isso também se reflete na obesidade. De acordo com os dados, um a cada quatro homens apresenta obesidade já instalada (12,5%) assim como uma a cada três mulheres (16,9%) (Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 IBGE). Já nos Estados Unidos, aproximadamente dois terços (66%) dos adultos norte-americanos e um quinto das crianças (10%) são obesos ou estão com sobrepeso (MMWR, 2009).

Sabe-se que a obesidade está associada com doença cardiovascular (DCV), câncer de cólon, câncer de mama, demência e depressão. A inflamação parece estar etiologicamente relacionada com a patogênese de todas estas condições e o desenvolvimento de um estado inflamatório subclínico crônico foi estabelecido como um preditor de risco para várias destas patologias (HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON 2006; OUCHI, 2011; ROOK, 2011; LEONARD, 2007; PRADHAN 2001).

O aumento de tecido adiposo gerado pela obesidade é porta de entrada para um grupo de anormalidades que envolvem dislipidemia, hipertensão e tolerância à glicose prejudicada, ocasionando uma síndrome metabólica, e tardiamente o Diabetes tipo 2 (SILVEIRA, 2008.).

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino devido à sua capacidade de produzir e liberar algumas citocinas ou adipocinas (proteínas liberadas pelos adipócitos), e o tamanho do tecido influencia a quantidade de citocinas liberadas (MACHADO, 2006). Estudos demonstram que, associado ao quadro dislipidêmico, o aumento da produção de adipocinas com efeitos pró-inflamatórios em decorrência do aumento do tamanho dos adipócitos na obesidade é um dos responsáveis pela resistência à insulina (TSUKUMO et al, 2007).

As citocinas modulam o comportamento funcional do tecido adiposo e outros tecidos, ao mesmo tempo em que criam mecanismos de retroalimentação entre eles levando ao quadro de inflamação crônica (MILANSKI et al, 2009).

O tecido adiposo produz uma quantidade relativamente grande de uma potente citocina pró – inflamatória, o fator de necrose tumoral (TNF alfa), fato este que o inclui como uma adipocina. Apenas uma parte do TNF alfa derivado do tecido adiposo se origina do próprio adipócito; uma considerável parte é secretada pelos macrófagos infiltrados no tecido, portanto particularmente importante na obesidade (KANDA, 2006).

Lumeng e colaboradores (2007) mostraram que animais obesos por dieta hiperlipídica apresentam uma maior polarização em macrófagos no tecido adiposo, a partir de um estado eutrófico, onde os macrófagos se encontram alternativamente ativados (maior presença de macrófagos M2 produtor de

citocinas anti-inflamatórias) para um estado classicamente ativado, mais pró-inflamatório (maior quantidade de M1 produtor TNF alfa, IL6 e óxido nítrico), além de mostrar uma importante citocina anti-inflamatória, a interleucina 10 (IL-10), que previne os danos causados pelo TNF alfa.

As relações entre a inflamação e a resistência à insulina têm sido investigadas por Hotamisligil e Spiegelman desde 1993 (HOTAMISLIGIL, 1993; HOTAMISLIGIL, 1994; HOTAMISLIGIL, 2000). Seus estudos se concentraram na produção de TNF alfa pelo tecido adiposo e sua capacidade em suprimir a sinalização mediada pelo receptor de insulina (IR) e de seus substratos (IRS). Embora a potência de predição da resistência à insulina pelo TNF alfa em humanos seja controversa, os seus resultados definem claramente o papel das cascatas de sinalização inflamatórias (TNF) e metabólicas (IR / IRS) na causa da resistência à insulina (SHOELSON, 2003).

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, cuja produção é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise, entre outros (GUYTON & HALL, 2002).

O resultado é a ativação de algumas enzimas e a inativação de outras para que assim a cascata de ativação da insulina atinja seu objetivo de recrutar o transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática para que ocorra a captação da glicose sérica. Isto ocorre em células musculares e adiposas. É

um transportador que altera sua expressão na presença de insulina (AUGUSTIN, 2010).

Dentre os modelos de indução a obesidade e resistência à insulina, a dieta hiperlipídica vem sendo utilizada frequentemente dada a sua praticidade e baixo custo (LAMAS, 2004; BERNARDES et al. 2004). O aumento da quantidade de tecido adiposo estocado nos animais a torna mais próxima do modelo de obesidade humana, o modelo exógeno. Diversos autores fazem o uso de alimentos ingeridos por humanos, geralmente com alto índice calórico e baixo valor nutricional para indução da obesidade em animais. Por ser uma dieta palatável é chamada de dieta ocidentalizada ou dieta de cafeteria (EGUCHI et al. 2008; ALMEIDA et al. 2008).

Desde a descoberta de uma citocina, a Interleucina-6, produzida pelas células musculares a partir da contração muscular e que parecia ter importantes efeitos metabólicos, passou-se a ter outra visão do músculo, o músculo esquelético é um órgão endócrino que secreta hormônios e outros peptídeos, os quais podem influenciar o metabolismo em vários tecidos e órgãos, exercendo efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos (PEDERSEN e FEBBRAIO 2008). A importante relação deste tecido com as dislipidemias oriundas da obesidade estão apenas começando (HENNINGSEN et al. , 2010).

Diversos estudos mostram mudanças positivas em fatores de risco da Síndrome Metabólica com intervenção de exercício físico aeróbico de baixa à moderada intensidade (CARROLL & DUDFIELD, 2004; MAXWELL et al., 2008; PRADO & DANTAS, 2002). Esta efetividade acontece, pelo menos em parte, pelo efeito anti-inflamatório do exercício físico. Neste sentido, os estudos evidenciam que este efeito pode ser mediado via redução da gordura corporal,

especialmente visceral, com subsequente diminuição da liberação de adipocinas pró-inflamatórias e aumento da síntese e liberação das adipocinas anti-inflamatórias tanto do tecido adiposo branco (TAB) como do músculo esquelético (MATHUR, 2008).

A adesão a um programa de exercício físico pode proporcionar várias alterações metabólicas e hormonais em diferentes tecidos (PERES et al., 2005, LUZ et al., 2011). O tecido muscular esquelético e o TAB são responsivos à ação da insulina, condição esta que pode ser influenciada por meio da redução dos depósitos de gordura visceral e subcutâneo (VIEIRA et al., 2009).

Neste sentido, o exercício reduz o risco de desenvolvimento de obesidade e adiposidade excessiva, além de promover a saúde cardiovascular, uma vez que melhora o perfil de lipídios no sangue, diminuindo a concentração plasmática de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumentando a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (KRAUS, 2002).

O aumento da captação de glicose verificado após o exercício é, em parte, devido à maior atividade e expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, bem como ao aumento do conteúdo e da translocação do GLUT4 no tecido muscular esquelético (FROSIG et al., 2007; TORRES-LEAL et al., 2010) e no TAB (HIRSHMAN et al., 1989; HIRSHMAN et al., 1993; STALLKNECHT et al., 1993; FERRARA et al., 1998).

Petersen e Pedersen (2005) evidenciaram que o aumento das citocinas anti-inflamatórias IL1ra e IL10, pela prática de exercício físico, estão relacionados com a liberação de IL6, a partir da fibra muscular. Esta citocina, por sua vez, além de induzir a lipólise, a oxidação de ácidos graxos e estar envolvida na homeostase glicêmica durante o exercício, ainda estimula a síntese de IL1ra,

TNFR e IL10, os quais inibem a síntese de IL1 α , IL1 β e TNF alfa de ação pró-inflamatória.

Lira et al. (2009) reportaram que 8 semanas de treinamento aeróbio a 55-65% do VO₂ máximo aumentaram a concentração de IL10 no tecido adiposo mesentérico, elevando, desta forma, a razão IL10/TNF em ratos.

Kawanishi e colaboradores, em 2010, evidenciaram que o exercício aeróbio em esteira rolante 5x por semana, tem o poder de prevenir a inflamação em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica por dois mecanismos distintos, reduzindo a infiltração de macrófagos M1, no tecido adiposo, e aumentando a diferenciação para M2 no mesmo tecido.

Nos últimos anos, surgiu o termo “time efficiency” em que vários pesquisadores têm verificado adaptações metabólicas e fisiológicas significativas quando da utilização de protocolos de treinamento mais curtos e com maior intensidade de trabalho no que diz respeito a patologias, como a obesidade e a síndrome metabólica (TALANIAN et al., 2007).

O treinamento em alta intensidade diminui o tecido adiposo visceral e age na perda de peso por aumentar o gasto energético total e o EPOC (excesso de consumo de oxigênio pós-exercício), aumentando a termogênese induzida pelo alimento e a atividade da leptina, além de diminuir a pressão arterial sistólica e diastólica e induzir à secreção de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (GUTIERREZ & MARTINS, 2008).

Os benefícios pós-exercício são maiores após a prática de atividades de alta intensidade, de caráter anaeróbio. O volume de treinamento é a variável mais relevante no gasto calórico, enquanto que a intensidade se mostra mais importante no período de recuperação (THORTON et al., 2002).

As alterações promovidas pelo treinamento de força em alta intensidade vêm sendo usado como uma ferramenta no controle glicêmico de pacientes diabéticos idosos, pela diminuição dos níveis de glicose sanguínea, aumento dos estoques de glicogênio muscular e redução da gordura do tronco (CIOLAC & GUIMARÃES, 2004), aumentando a sensibilidade dos receptores celulares à insulina, parecendo ainda ter efeito benéfico sobre o perfil lipídico, diminuindo LDL-C (MEIRELLES & GOMES, 2004).

Estudos em nosso laboratório mostram que a longo prazo, o treinamento intermitente pode melhorar a sensibilidade à insulina e diminuir os níveis basais de citocinas, que desempenham papel negativo no metabolismo da glicose de ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (PANVELOSKI-COSTA et al, 2011).

Entretanto estudos mostram que este efeito benéfico do exercício se encerra com a interrupção do treinamento físico. O destreinamento resulta em rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina, tanto em humanos, quanto em animais (PETIBOIS et al., 2004; KUMP & BOOTH, 2005; YASARI et al., 2006; YASARI et al., 2007). Tal afirmação pode ser reforçada por outros estudos que demonstraram que a sensibilidade à insulina decresce em alguns dias, quando indivíduos fisicamente ativos se tornam sedentários. A diminuição na captação de glicose é acompanhada por uma diminuição de proteínas da cascata de sinalização da insulina nestes indivíduos (KUMP & BOOTH, 2005), diminuição na expressão do receptor de insulina (IR), da fosforilação em tirosina do IR, fosforilação da Akt, e quantidade de GLUT4, após estímulo com insulina em músculo esquelético. As alterações acontecem 29 e 53 horas após a última sessão de exercício físico.

Entretanto, até o presente momento não foi possível determinar o papel exato de cada um dos mecanismos envolvidos, porém é provável que exista uma relação de dependência com o tipo, frequência, intensidade e duração do exercício realizado (GLEESON, 2011).

Assim, este estudo tem como objetivo analisar o efeito de um programa de treinamento de alta intensidade e um período equivalente de interrupção (destreinamento) sobre a sensibilidade à insulina e inflamação em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

Para isso elaboramos dois trabalhos que serão apresentados em seguida. O primeiro deles, intitulado “Treinamento intermitente de alta intensidade previne resistência insulina e inflamação muscular em ratos obesos induzidos por dieta mesmo após período de destreinamento”.

O segundo, intitulado: “Alterações provocadas pelo treinamento perduram após 9 semanas de destreinamento”.

ARTIGO 1

**Efeitos do treinamento e destreino de alta intensidade em ratos
submetidos a dieta hiperlipídica**

Effects of high intensity training and detraining in rats fed by fat diet

Rafael Junges Moreira (1), Lucas Agostini (1), Armando Florido Ribeiro Neto (1), Ana Carolina Panveloski Costa (2), Maria Tereza Nunes (2), Patricia Monteiro Seraphim (1)

1. Departamento de Fisioterapia, Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP – Campus Presidente Prudente, SP, Brasil.
2. Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Fisiologia Endócrina: Regulação Hormonal e Expressão Gênica, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

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

Resumo

Objetivo: Investigar o efeito do treinamento intermitente de alta intensidade realizado concomitantemente à ingestão de dieta hiperlipídica sobre a sensibilidade à insulina, expressão de proteína pró-inflamatória TNF α e de transportador de glicose GLUT4 em músculo esquelético de ratos. **Materiais e**

métodos: Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica (grupos obesos) foram submetidos ao protocolo de exercício tipo jump squat por 9 semanas, seguido por 9 semanas de cessação do protocolo. A sensibilidade à insulina e conteúdo proteico de TNF- α e GLUT4 foram comparadas entre os grupos Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (O), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). **Resultados:** A sensibilidade à insulina apresentou-se reduzida no grupo O e O7, e elevada nos grupos submetidos ao treinamento CE, CD, OE, OD. O conteúdo de TNF- α apresentou-se aumentado no músculo esquelético do grupo submetido à dieta hiperlipídica O, e reduzido nos grupos exercitados CE, CD, OE, OD. O conteúdo proteico de GLUT4 não diferiu entre os grupos. **Conclusão:** O treinamento intermitente de alta intensidade realizado concomitantemente com a ingestão de dieta hiperlipídica previne o quadro de resistência à insulina periférica, sem alterar o conteúdo de proteína GLUT4 no músculo esquelético, porém reduzindo a inflamação muscular local.

Palavras Chave: Exercício Físico; Destreinamento; Sensibilidade à insulina; Dieta hiperlipídica; TNF- α ; GLUT4.

Abstract

Objective: To analyze the effect of high-intensity intermittent training plus intake of high-fat diet on insulin sensitivity, pro-inflammatory protein TNF-alpha and glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle of rats. **Methods:** Wistar male rats fed with high-fat diet (obese group) underwent the protocol of exercise, jump

squat type, during 9 weeks, followed by 9 weeks of cessation. Insulin sensitivity and protein content of TNF- α and GLUT4 were compared among Sedentary Control (C), control exercise (CE), Obese Sedentary (O), Obese Exercise (OE), Control 7-month old (C7) exercised control detrained (CD), Obese 7-month old (O7) and Obese exercised detrained (OD). **Results:** Insulin sensitivity was reduced in O and O7, and elevated in CE, CD, OE, OD. TNF- α content was increased in skeletal muscle of group submitted to the high-fat diet and reduced in exercised groups CE, CD, OE, OD. GLUT4 protein content did not change among groups. **Conclusion:** High-intensity intermittent training performed in the presence of high-fat diet prevents the peripheral insulin resistance and skeletal muscle inflammation, without changing total protein content GLUT4, even after 9 weeks detraining.

Key Words: Exercise; Detraining; Insulin Sensitivity, Hyperlipidic Diet; TNF- α ; GLUT4.

Introdução

O padrão alimentar está intimamente ligado com o aparecimento dos casos de Diabetes Mellitus tipo 2, sendo o principal responsável a alta ingestão de alimentos processados como salsicha, mortadela e bacon, por exemplo,

contribuindo em 51% para a gênese da patologia, principalmente pela alta quantidade de gordura saturada, sódio e nitritos[1].

A resistência insulínica no diabetes tipo 2 precede o início da hiperglicemia, a literatura indica que a alteração patológica inicial se encontra na redução da captação de glicose pelo músculo esquelético [2]. Este parece ser o prelúdio do diabetes tipo 2. Indivíduos obesos são caracterizados por um estado de baixo grau de inflamação que pode ser a causa da resistência insulínica e outras desordens associadas à obesidade como dislipidemia e aterosclerose [3].

O primeiro elo identificado entre inflamação, obesidade e resistência à insulina foi a descoberta do fator de necrose tumoral α (TNF- α) [4]. A partir de então surgiram cada vez mais evidências da existência de uma resposta inflamatória na obesidade [5]. Estudos demonstram que uma dieta rica em lipídeos eleva os níveis das citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α), o qual vem a atuar diretamente inibindo a ativação da via de sinalização da insulina comprometendo o transporte da glicose pelo transportador GLUT4 [6] e inibindo o gene Slc2a4 que codifica o GLUT4 [7], tendo sido confirmado o mesmo efeito em humanos [8]. O GLUT4 pertence a uma família de 13 diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose, sendo a principal isoforma presente no músculo esquelético e regulada pela insulina e atividade contrátil [9].

O treinamento físico produz adaptações metabólicas que resultam em melhora sustentada da sensibilidade insulínica, além da redução de citocinas que desempenham papel negativo no metabolismo da glicose [10,11]. Durante o exercício a exigência crescente de substratos metabólicos é atendida pela elevação da taxa de glicogenólise no músculo em contração, além de haver um

aumento da captação de glicose circulante. O treinamento físico de curta duração leva a um rápido aumento da expressão do GLUT4 no músculo esquelético [12].

A contração muscular per se, pode aumentar até quatro vezes a quantidade de GLUT4 na membrana [13], entretanto a interrupção do treinamento é velozmente acompanhada por uma diminuição de proteínas da cascata de sinalização da insulina [14], diminuição na expressão do receptor de insulina (IR), da fosforilação em tirosina do IR, fosforilação da Akt e quantidade de GLUT4 após estímulo com insulina em músculo esquelético. As alterações acontecem 29 e 53 horas após a última sessão de exercício físico [14].

O peso de cada componente e quanto perduram os benefícios promovidos pelo exercício relacionado à sensibilidade à insulina e à inflamação não estão bem esclarecidos na literatura. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel da imposição de dieta hiperlipídica associada ao treinamento físico sobre a expressão de marcador inflamatório e de proteína transportadora de glicose em músculo esquelético de ratos Wistar, bem como verificar o efeito do destreinamento sobre estes parâmetros.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar adultos (60 dias) foram mantidos no biotério de experimentação na Universidade de origem, em gaiolas coletivas, não excedendo cinco animais por gaiola, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ controlados. Os animais controles (C, CE, CD) foram alimentados com ração padrão (Supra Lab – Alisul Ind. Alimentos LTDA., São

Leopoldo, RS) e água *ad libitum*. Aos grupos obesos (O, OE, OD) foi ofertada uma dieta hiperlipídica (dieta de cafeteria), utilizada por nosso grupo em estudos anteriores [11; 15] composta por: bacon, mortadela, salsicha, bolacha e refrigerante e ração padrão. A dieta se manteve em ambas as fases do estudo (treinamento e destreinamento).

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 04/2011.

Os animais foram adaptados ao modelo de exercício uma semana antes do início do protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade tipo jump squat. A adaptação consistiu na realização de três sessões sem incremento de carga composta de uma, duas e três séries de 12 repetições do primeiro ao terceiro dia respectivamente, com intervalo de 24 horas entre cada sessão (CE; OE; CD; OD).

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

O protocolo de treinamento consistiu em três sessões semanais, intervaladas por 24 horas, sendo que cada sessão consistiu na realização de três séries de 12 repetições com intervalos de 60” entre cada série. O treinamento se iniciou juntamente com a dieta hiperlipídica, quando os animais atingiram a idade jovem adulta, aos três meses de idade. Os animais submetidos ao protocolo de exercício foram escolhidos de maneira randômica.

Destreinamento

Ao final da nona semana de treinamento, parte dos animais foram sacrificados e o remanescente foi submetido ao destreinamento, que consistiu na interrupção do treinamento e manutenção da dieta por 9 semanas subsequentes (CD;OD).

Grupos controles foram mantidos durante todo este período, compondo os grupos C7 (controles de 7 meses), O7 (obesos de 7 meses – alimentados com a dieta hiperlipídica).

Teste de Tolerância à Insulina

Os animais foram mantidos a 8 horas de jejum, após o qual o sangue foi coletado por punção caudal que corresponderia ao tempo “zero” do estudo, sendo administrada uma injeção intraperitoneal de insulina regular na dose de 1 μ U / kg de peso corpóreo, com posterior coleta sangue por punção caudal nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção, utilizando glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil) para determinação da glicemia [15]. O teste foi realizado em 2 momentos: ao final do protocolo de treinamento (grupos CS, CE, OS, OE), e ao final do destreinamento (grupos C7, O7, CD, OD).

Índice de Lee

Como indicativo de massa corpórea foi calculado o Índice de Lee (similar ao Índice de massa corpórea para humanos), considerando-se a raiz cúbica do peso corpóreo (em gramas) dividido pelo comprimento nasoanal (em cm) x 10.

Coleta do material

Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos a doze horas de jejum e foram sacrificados após anestesia (Xilasina e Quetamina – dose de 60 mg/kg do peso corporal de cada componente), via intraperitoneal. Em seguida, foram retirados o músculo gastrocnêmio e o tecido adiposo branco periepididimal (TA).

Quantificação de Proteínas

A detecção das quantidades de proteínas foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, com a utilização de quimiluminescência para detecção das bandas. Resumidamente, o método realizado foi Western blotting com o processo de fracionamento em membranas totais do tecido muscular gastrocnêmio. Para isso os tecidos musculares foram homogeneizados em tampão contendo: Sacarose 250mM; Hepes 20mM, EDTA 2mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) e centrifugados a 12.000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polietileno tipo eppendorf.

A concentração de proteína total foi avaliada através do método de Bradford. Quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após bloqueio com albumina sérica bovina em PBS 8% durante 1 hora, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-TNF (Chemicon) (diluição 1:1000 em PBS) e anti-Glut4 (Chemicon) (1:1000 em PBS)

durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho), marcado com enzima peroxidase (HRP) (GE Healthcare, Amersham, UK), diluído 1:5000 em solução bloqueadora durante 1 hora (5% de leite em pó desnatado+ 20 ml de PBS 1X + 0,05% de Tween 20). A membrana foi lavada vigorosamente com tampão PBS 1x e colocada em contato com 5mL da reação de quimiluminescência (Luminol 1,1%, Ácido. P-Cumárico 0,48%, Tris 1M (pH 8,5) 11,1%, H₂O₂) por 2 minutos e, posteriormente exposta ao Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) para detecção das bandas resultantes. O filme foi fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as imagens foram analisadas por densitometria óptica utilizando-se o software Scion Image for Windows (Scion Corporation, EUA).

Os anticorpos anti-TNF alfa e anti-GLUT4 utilizados consistiram em antissoro comercial de coelho (Chemicon International, Temecula, Califórnia).

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi confirmada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos valores de peso corporal, constante de decaimento da do ITT, dados morfométricos e conteúdo proteico utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA – One Way) para medidas repetidas, seguida, quando necessário, com teste Post-hoc de Tukey. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para $p < 0,05$.

Resultados

Os animais submetidos à dieta hiperlipídica (O) por 9 semanas apresentaram aumento de 24% ($p < 0,05$) no peso corpóreo, comparado ao grupo

que recebeu apenas ração C, 40% ($p < 0,001$), comparado ao grupo CE e 18% ($p < 0,01$), comparado ao grupo que recebeu o combinado dieta + exercício (OE). Este aumento foi acompanhado por aumento expressivo na massa adiposa 85% ($p < 0,01$) em relação ao grupo C, 226% ($p < 0,001$) comparado a CE, porém atenuado pelo exercício (40% $p < 0,05$ vs OE).

Passado o período de destreinamento houve manutenção da diferença (25%, $p < 0,01$) do peso corpóreo dos animais submetidos à dieta (O7) e dos animais controle de mesma idade (C7), entre os animais O7 e CD (36%, $p < 0,001$), porém quando comparados O7 e animais destreinados + dieta (OD) não houve diferença entre os grupos. Já na massa adiposa periepídimal as 18 semanas de dieta (O7) apresentou um aumento de 115% ($p < 0,01$) em relação ao grupo C7, 494% comparados aos animais CD, sem alteração, se comparados aos animais OD. Por outro lado, houve uma queda de 64% na massa adiposa dos animais destreinados, comparados aos que nunca realizaram exercício (CD vs C7, $p < 0,01$).

Inserir tabela 1

Em relação à sensibilidade à insulina, com 9 semanas de dieta, o grupo O apresentou uma diminuição de 57% ($p < 0,05$) comparado ao grupo C, porém o exercício foi capaz de melhorar este quadro nos animais que receberam o exercício, independente da dieta (CE; OE), quando comparado ao grupo O ($p < 0,001$ para ambos). Já os animais que tiveram a interrupção do exercício por 9 semanas, CD e OD apresentaram a sensibilidade à insulina 38% ($p < 0,01$) e 25% maiores em relação aos animais controles (C7), e 106% ($p < 0,001$) e 87%

($p < 0,001$) maiores quando comparado aos animais submetidos apenas a dieta (O7).

Inserir Figura 1

Quando avaliado o conteúdo proteico de TNF no músculo esquelético gastrocnêmio dos animais, o grupo O apresentou uma elevação de 47% ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo C, e o treinamento foi capaz de mantê-lo reduzido em 58% ($p < 0,01$ vs CE; $P < 0,05$ vs OE) para ambos os grupos exercitados, quando comparado aos animais O (Figura 2). Após o período de destreinamento não houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

Inserir Figura 2

O conteúdo proteico do GLUT4 (Figura 3) não variou entre os grupos, embora se observe maior conteúdo nos animais sacrificados no primeiro momento (C, CE, O, OE).

Inserir Figura 3

Discussão

A prevalência da obesidade tem crescido rapidamente e representa um dos principais desafios de saúde pública neste início de século. Alimentação inadequada e sedentarismo contribuem diretamente com esse crescimento. Assim, com o excesso de tecido adiposo (TA), alterações metabólicas causadas pelo seu aumento, como hipertensão arterial, dislipidemias, resistência à insulina

(RI) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) têm-se tornado alvo de interesse e de estudo.

Na literatura, estudos mostram que o aumento significativo de TA aumenta a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), e IL-6 (Interleucina-6), e esse aumento está correlacionado com a diminuição do transportador de glicose GLUT4 e sinalização de insulina. Pesquisas mostram que a alteração na homeostase glicêmica causada pela obesidade RI ou DM2 pode ser controladas por mudanças nos hábitos alimentares e exercício físico [16;17].

O exercício físico colabora para a perda de peso em obesos, reduzindo o risco de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, demência, câncer de cólon, câncer de próstata, mama, útero e também reduz o risco de mortalidade. A redução na adiposidade utilizando o exercício como intervenção terapêutica já é bem evidenciada na literatura [18;19], porém, em sua grande maioria, os estudos se concentram em indivíduos já obesos [20;21;22], sendo o diferencial deste estudo investigar o efeito do exercício e da dieta simultaneamente empregados sobre padrão de expressão de proteínas envolvidas no controle glicêmico e estado de resistência à insulina, bem como verificar o efeito do destreinoamento sobre tais parâmetros.

A baixa adiposidade observada ao final do treinamento não foi novidade [11; 15], entretanto um fato interessante ocorreu quando analisamos a adiposidade dos animais do grupo que passou pelo processo de destreinoamento (CD), nos quais não se observou aumento, mas manutenção do padrão de adiposidade de quando o exercício se encontrava ativo (CD vs CE) e reduzido em 64% quando comparado com o grupo controle de mesma idade (C7),

mostrando que as modulações durante o período ativo se mantêm mesmo após o sobrestar da atividade, desde que se mantenha uma dieta equilibrada, pois o mesmo padrão não foi observado nos animais submetidos ao mesmo protocolo de treinamento e destreino com a dieta hiperlipídica (10% apenas de redução da adiposidade para o grupo OD comparado ao O7).

Alteração similar foi observada quando avaliada a constante de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina (KITT) dos animais submetidos ao protocolo de treinamento e destreino (CD;OD), a qual se manteve elevada quando comparada a seus respectivos controles (C7;O7), contrariando a ideia de que a interrupção da atividade leva a rápido aumento da massa adiposa e instalação de resistência à insulina, ainda que estas alterações possam ser fruto do modelo de exercício e intensidade, o diferencial deste estudo já que na grande maioria de estudos anteriores o modelo proposto sempre em foco se dá no modelo de esteira rolante com intensidade moderada ou baixa [23; 24; 25; 26].

A relação entre sensibilidade à insulina e citocinas inflamatórias existe desde 1993 e já está bem caracterizada na literatura. Yaspelkis e cols. [27] observaram que os componentes da via pró-inflamatória são ativados em músculos esqueléticos de animais alimentados com dieta hipercalórica. Em concordância com essas observações, os achados do presente estudo mostram que o conteúdo proteico de TNF- α aumentou no músculo esquelético gastrocnêmio de ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 9 semanas (O) de maneira significativa, comparado aos demais grupos. Uma das vias pela qual o TNF- α induz a resistência à insulina é o estímulo da lipólise no tecido adiposo, gerando aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, que eventualmente contribui para o desenvolvimento desse fenótipo resistente à

insulina [28]. Karagounis e cols. [29] mostraram que o Treino Resistido (TR) realizado por intervalos de 48 horas entre cada sessão promove redução do conteúdo de TNF-a no músculo de ratos treinados após 24 e 48 horas da quinta sessão de treinamento. No presente estudo, a redução dos níveis de TNF-a no músculo pode justificar a melhora da sensibilidade à insulina periférica nos animais submetidos ao exercício, entretanto um fato observado foi que, após 9 semanas sem exercício, os níveis continuaram reduzidos, sugerindo um efeito protetor contra a inflamação ocasionado pelo exercício na própria musculatura. Este fator preventivo está de acordo com o achado de Kawanishi e cols [30] que propuseram que o exercício físico é capaz de prevenir a inflamação por impedir o aumento da expressão do TNF-a ocasionada pela dieta hiperlipídica, e capaz de evitar a polarização de macrófagos reduzindo a infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo, e aumento da diferenciação de macrófagos M1 para M2 no mesmo tecido.

Essa resposta ao treinamento resistido, provavelmente, pode ter sido promovida por adaptações positivas na capacidade oxidativa do músculo e, dessa forma, pode ter aumentado a metabolização de lipídios, reduzindo ou limitando os fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, melhorando a sensibilidade à insulina, ademais se sabe que o músculo é capaz de produzir atualmente cerca de 50 citocinas atuando como um órgão endócrino [31], sendo que, algumas de caráter a combater inflamação como a IL10. Lumeng e cols[32] demonstraram que a IL10 previne os efeitos prejudiciais do TNF-a na captação de glicose do tecido adiposo bloqueando sua ação, sem que ocorra redução dos níveis de TNF-a. O mesmo visto por Hong e cols [33], pode ter ocorrido neste

estudo, o exercício pode ter sido capaz de elevar e manter elevado, mesmo após o destreinamento, os níveis de il-10, prevenindo assim os efeitos do TNF-a.

A constituição da dieta, mais precisamente seu teor lipídico, modula fortemente a expressão de GLUT4 (34,35), entretanto, contrariamente a essas observações, no presente estudo a dieta hiperlipídica não surtiu efeito significativo em modular o conteúdo proteico nos animais obesos, achado similar ao encontrado por Brandt e cols.[36], que também não encontraram alterações do conteúdo proteico de GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a uma dieta hipercalórica, bem como ao encontrado por nosso grupo em outro estudo [11]. Sabe-se que a quantidade de GLUT4 no músculo é reduzida rapidamente após a cessação do treinamento [37]. Alguns autores demonstraram que esta quantidade retorna ao valor normal, 40 [38] ou 90 horas [39] após a última sessão de exercício. No presente estudo, nota-se uma tendência ao aumento no conteúdo de GLUT4 no tecido muscular dos animais submetidos ao protocolo de exercício, na primeira parte do estudo. Porém, o mesmo não se observa ao final do período de destreinamento, talvez pelo fato da coleta do tecido ocorrer após 9 semanas da última sessão de exercício.

Pelos achados no presente estudo, podemos concluir que a dieta hiperlipídica induz obesidade com ganho da massa adiposa, prejuízo na sensibilidade à insulina e aumento de marcador inflamatório na musculatura, e que o treinamento intermitente de alta intensidade tem papel primordial e eficaz em atenuar e até prevenir essas alterações, mesmo após 9 semanas de sua interrupção (destreinamento), sem modular o conteúdo proteico de GLUT4.

Referências

1. PAN, A., *et al.* Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta –analysis. **Am J Clin Nutr.** 94: 1 –9.2011.
2. Petersen KF and Shulman GI. Etiology of insulin resistance. **Am J Med.** 2006: 119(5 Suppl 1): S10-6.
3. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, and Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2007: 18(3-4): 313-25.
4. Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science.** 1993: 259(5091): 87-91.
5. Zecchin HG SM, Bases Moleculares do Diabete Melito Tipo 2. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB. **Endocrinologia.** 2007, São Paulo: Atheneu
6. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, and Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J Clin Invest.** 1994: 93(6): 2438-46
7. HOTAMISLIGIL, G. S., *et al.* Adipose expression of tumor necrosis fator – alpha: direct role in obesity – linked insulin resistance. **Science.** 259: 87 – 91. 1993
8. MINGRONE, G.; ROSA, G.; DI ROCCO, P.; MANCO, M.; CAPRISTO, E.; CASTAGNETO, M.; VETTOR, R.; GASBARRINI, G.; GRECO, A. V. Skeletal muscle triglycerides lowering is associated with net improvement of insulin sensitivity, TNF-alpha reduction and GLUT4 expression enhancement. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26,n. 9, p. 1165-72, 2002.
9. Hayashi T, Wojtaszewski JF, and Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am J Physiol.** 1997: 273(6 Pt 1): E1039-51

10. Hawley JA and Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiol (Oxf)**. 2008; 192(1): 127-35.
11. COSTA, A. C. P. ; PINTO JUNIOR, D. A. C. ; BRANDAO, B. B. ; MOREIRA, R. J. ; MACHADO, Ubiratan Fabres ; SERAPHIM, P. M. . O treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Impresso)**, v. 55, p. 140-148, 2011.
12. Kranjic GN, Cameron-Smith D, and Hargreaves M. Effect of short-term training on GLUT4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. **Exp Physiol**. 2004; 89(5): 559-63
13. Lund S, Holman GD, Schmitz O, and Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995; 92(13): 5817-21
14. KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol**, v. 562, n. Pt 3, p. 829-838, 2005.
15. PINTO JUNIOR, D. A. C. ; SERAPHIM, P. M. . Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in wistar rats. **Revista de Nutrição (Impresso)**, v. 25, p. 313-319, 2012.
16. ZIERATH, J. R. Exercise Effects of Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, n. 93, p. 773-781, 2002.
17. TSAO, T. et al. Metabolic adaptations in skeletal muscle overexpressing GLUT4: effects on muscle and physical activity. **FASEB**, n. 15, p. 958-969, 2001.

18. ROPELLE, E., e J. CAMPELLO, J. PAULI. “Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica.” **Motriz**, v. 11;p. 24-55; 2005.
19. KRISKA, A. et. al. “Physical Activity, Obesity, and the Incidence of Type 2 Diabetes in a High-Risk Population.” **American Journal of Epidemiology**, v. 158, n. 7; p.669–675; Abril, 2003.
20. BROEDER, Ce. et al. The effects of either high-intensity resistance or endurance training on resting metabolic rate. **Am J Clin Nutr.**, United States. Texas. v. 55., n° 4., p. 802-10.
21. FERNANDEZ, A. C. et al. Influência do treinamento aeróbio e anaeróbio na massa de gordura corporal de adolescentes obesos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n° 3, mai/jun, 2004.
22. KRAEMER, W.J. et al. Influence of exercise training on physiological and performance changes with weight loss in men. **Med Sci Sports Exerc.**, 31(9):1320-9, sep. 1999.
23. PETIBOIS, C. et al. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 7, p. 3377-84, 2004.
24. KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol**, v. 562, n. Pt 3, p. 829-838, 2005.
25. YASARI, S. et al. Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n. 4, p.367-75, 2006.
26. YASARI, S. et al. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. **Physiol Behav**, v. 91, n. 2-3, p. 281-9, 2007.

27. YASPELKIS BB, KVASHA I, LESSARD S, RIVAS D, HAWLEY J. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signaling in rat skeletal muscle. **Eur J App Physiol** v.110, n.4, p.779-88, 2010.
28. POPA C, NETEA MG, VAN RIEL PLCM, VAN DER MEER JWM, STALENHOF AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **J Lipid Res** n.48, p. 751-62, 2007.
29. KARAGOUNIS LG, YASPELKIS BB, REEDER DW, LANCASTER GI, HAWLEY JA, COFFEY VG. Contraction-induced changes in TNF- α and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol** n.109, p. 839-48, 2010.
30. Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. & Suzuki, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc. Immunol. Rev.** 16, 105–118 (2010).
31. Pedersen, B. K. & Fischer, C. P. Beneficial health effects of exercise — the role of IL-6 as a myokine. **Trends Pharmacol. Sci.** 28, 152–156 (2007).
32. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J. Clin. Invest.** 117, 175–184 (2007).
33. Hong, E. G. *et al.* Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes** 58, 2525–2535 (2009).
34. Lessard SJ, Rivas DA, Chen Z-P, Bonen A, Febbraio MA, Reeder DW, et al. Tissue-specific effects of rosiglitazone and exercise in the treatment of lipid-induced insulin resistance. **Diabetes.** 2007;56(7):1856-64.

35. Yaspelkis BB, Lessard SJ, Reeder DW, Limon JJ, Saito M, Rivas DA, et al. Exercise reverses high-fat diet-induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin- signaling cascade in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2007;293(4):941-9.

37. Vukovich MD, Arciero PJ, Kohrt WM, Racette SB, Hansen PA, and Holloszy JO. Changes in insulin action and GLUT-4 with 6 days of inactivity in endurance runners. **J Appl Physiol.** 1996: 80(1): 240-4.

38. Host HH, Hansen PA, Nolte LA, Chen MM, and Holloszy JO. Rapid reversal of adaptive increases in muscle GLUT-4 and glucose transport capacity after training cessation. **J Appl Physiol.** 1998: 84(3): 798-802.

39. Kawanaka K, Tabata I, Katsuta S, and Higuchi M. Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training. **J Appl Physiol.** 1997: 83(6): 2043-7.

Anexos

Tabelas

Tabela 1. Índice de Lee, Peso tecidual e dos animais: Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (O), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7), Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD).

Grupos	Peso corpôreo Final (g)	Tecido Adiposo Periepididimal (g)	Gastrocnêmio (g)	Índice de Lee
C	420±53,4	4,42±1,73	2,680±0,319	30,71±0,30
CE	373±13,6	2,51±0,59	2,340±0,135	29,46±0,41
O	523±62,1 ^{ab}	8,20±2,43 ^{bdf}	2,682±0,176	31,53±1,06 ^{bl}
OE	443±18,1	5,83± 1,23 ^{eg}	2,290±0,169	30,62±0,26
C7	442±56,1	5,96±1,35 ^{gl}	2,973±0,311 ^{gj}	31,10±0,85 ^o
CD	408±17,8	2,16±0,42	2,570±0,219	30,07±0,48
O7	556±51,1 ^{cd}	12,84±2,32 ^{bdhjm}	2,925±0,108 ^{gj}	31,64±0,46 ^{bl}
OD	520±70,6 ^d	11,51±1,60 ^{bdijm}	3,058±0,475 ^{bjR}	30,99±1,02 ^b

Figuras

Figura1

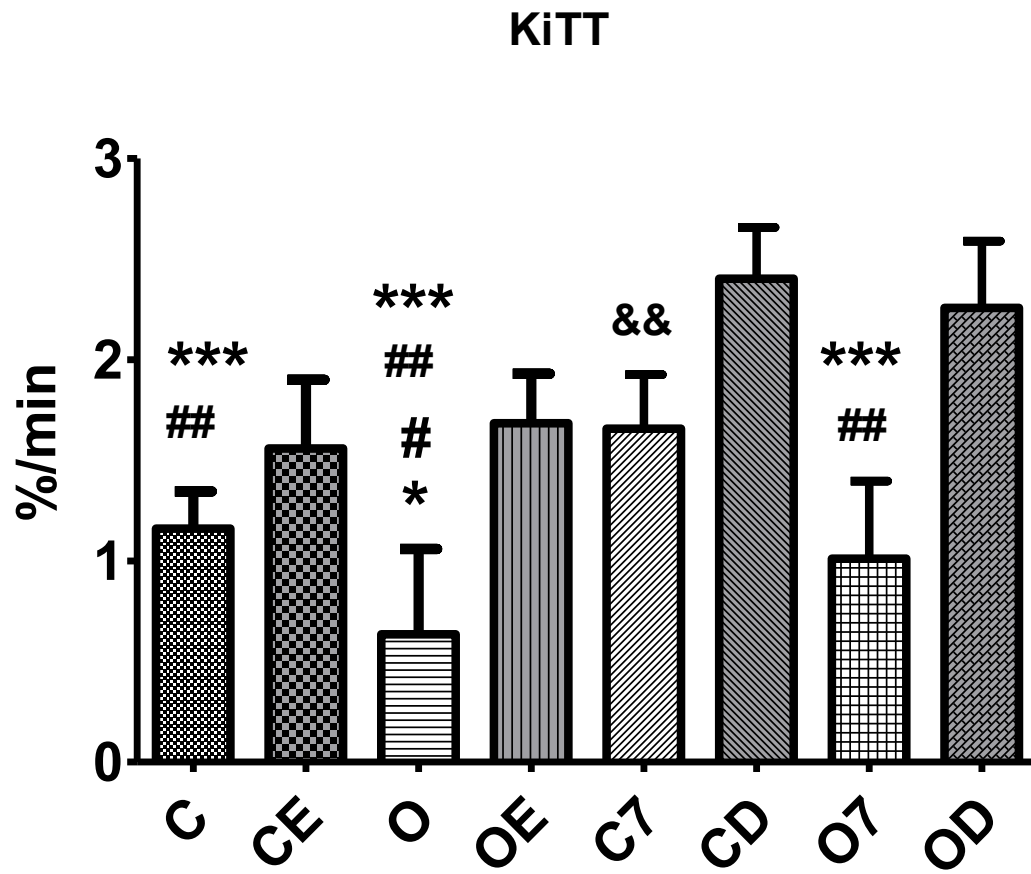
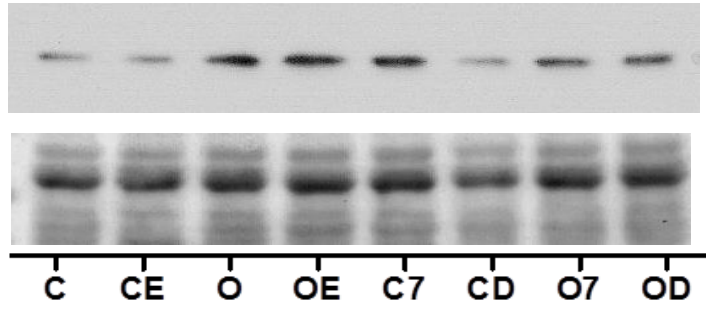


Figura2



TNF- α

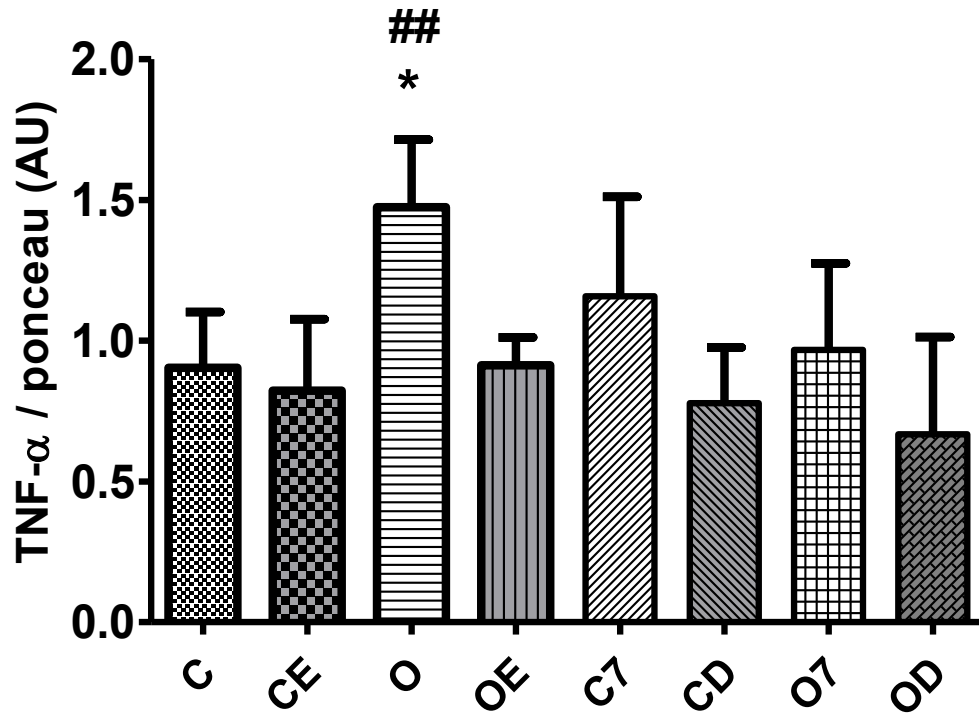
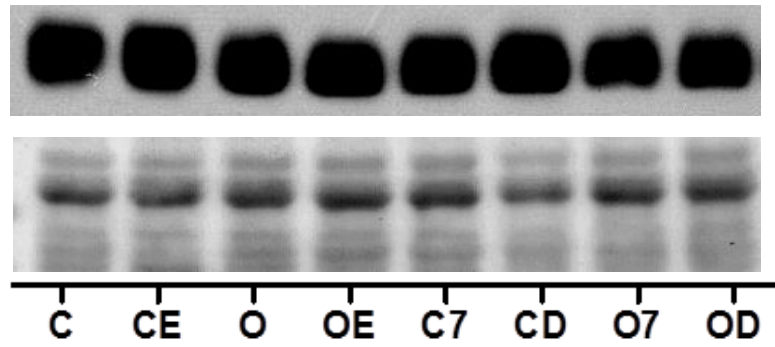
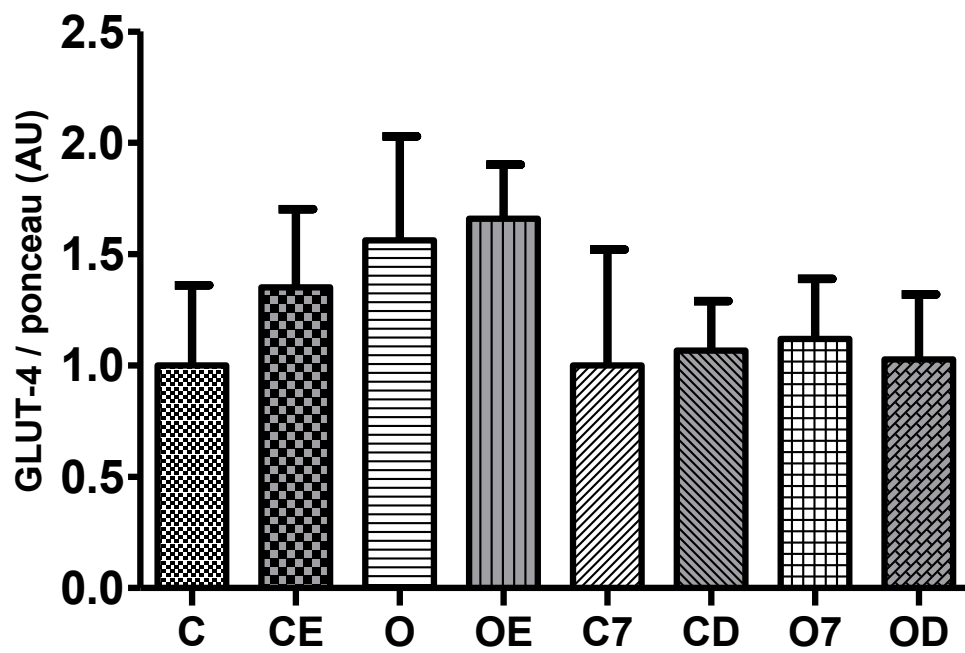


Figura3



Glut-4



Legenda das tabelas

Valores expressos em média \pm desvio padrão. (n= 5 a 8 animais por grupo) ^a
p<0,05 vs C; ^b p<0,001 vs CE; ^c p<0,01 vs C7; ^d p<0,001 vs CD; ^e p<0,01 vs OE;
^f p< 0,01 vs C; ^g p< 0,01 vs CE; ^h p< 0,001 vs O; ⁱ p< 0,01 vs O; ^j p< 0,001 vs
OE; ^l p<0,01 vs CD; ^m p<0,001 vs C7; ⁿ p<0,01 vs O6; ^o p<0,05 vs CE; ^p p<0,001
vs C; ^Qp<0,05 vs OE; ^R p<0,05 vs CD.

Legenda das figuras

Figura 1. Gráfico representativo do KiTT ao final do protocolo de treinamento e ao final período de destreino (n= 5 a 8 animais por grupo): Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7), Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). *P< 0,05 vs C, #P< 0,01 vs CE e OE; ##P< 0,01 vs C7, &&P<0,01 vs CD e OD, *** P< 0,001 vs CD e OD.

Figura 2. Conteúdo de proteína Tnf corrigidos por ponceau no músculo esquelético gastrocnêmio, expressos em unidades arbitrárias. * P< 0,05 vs OE, CD,** P< 0,01 vs C, CE, OD. (n= 4 animais por grupo) Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7), Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD).

Figura 3. Conteúdo de proteína *GLUT4* corrigido por ponceau no músculo esquelético gastrocnêmio, expressos em unidades arbitrárias (n=4 animais por grupo). Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7), Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD).

ARTIGO 2

Alterações morfológicas após 9 semanas de destreino

Morphological changes after 9 weeks of detraining

Rafael Junges Moreira (1), Lucas Agostini (1), Armando Florido Ribeiro Neto (1),
Ubiratan Fabres Machado (2), Patricia Monteiro Seraphim (1).

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

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

Resumo

Objetivo: Investigar o efeito de 9 semanas treinamento intermitente de alta intensidade associado a ingestão de dieta hiperlipídica seguido de destreino, sobre a sensibilidade à insulina, expressão gênica de Tnf, Slc2a4 e Pgc1a em músculo esquelético oxidativo de ratos após 9 semanas de destreino. **Materiais e métodos:** Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica (grupos obesos) submetidos ao protocolo de exercício tipo jump squat por 9 semanas, seguido por 9 semanas de cessação do protocolo. A tolerância à glicose e a expressão dos genes foram comparadas entre os grupos Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (O), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). **Resultados:** A tolerância à glicose apresentou-se reduzida no grupo O e O7, e elevada nos grupos submetidos ao treinamento e destreino CE, CD, OE, OD. A expressão de RNAm de Tnfa apresentou-se elevada no músculo esquelético oxidativo do grupo submetido à dieta hiperlipídica O, e reduzido nos grupos exercitados CE, CD, OE, OD. A expressão de RNAm de Pgc1a se mostrou reduzida nos animais submetidos a dieta hiperlipídica O e O7, e elevada nos grupos exercitados/destreinados CE, OE e CD, Já a expressão de mRNA do Slc2a4 aumentou apenas no grupo CE. **Conclusão:** Os efeitos do treinamento intermitente de alta intensidade realizado concomitantemente com a ingestão de dieta hiperlipídica perduram após 9 semanas da última sessão de exercício, prevenindo o quadro intolerância à glicose juntamente com redução na expressão de citocinas inflamatórias locais.

Palavras Chave: Exercício Físico; Destreino; Tolerância á glicose; Dieta hiperlipídica; Tnf; Slc2a4.

Abstract

Objective: To investigate the effect of 9 weeks of high-intensity intermittent training associated with the intake of high fat diet followed by detraining on insulin sensitivity, gene expression of *Tnf*, *Slc2a4* and *Pgc1a* in oxidative skeletal muscle of rats after 9 weeks of detraining. **Materials and Methods:** Male Wistar rats fed high fat diet (obese group) underwent the exercise protocol type jump squat for 9 weeks, followed by 9 weeks of detraining. Tolerance to glucose and gene expression were compared between groups Sedentary Control (C) , control exercise (CE) , Obese Sedentary (O) , Obese Exercise (OE) , Control 7 months (C7) exercised control Untrained (CD) obese 7 months (O7) and obese exercised Untrained (OD) . **Results:** Tolerance to glucose presented decreased in group O and O7, and high in the groups submitted to training and detraining CE, CD, OE, OD. The mRNA expression of *Tnf* showed up high in skeletal muscle oxidative fat diet group put on O, and reduced in the exercised groups CE, CD, OE, and OD. The mRNA expression *Pgc1a* were low in animals subjected to the high-fat diet and O7, and high in the groups trained / untrained CE, OE & CD, The expression of mRNA of *Slc2a4* differed only in the CE group. **Conclusion:** The effects of high-intensity intermittent training conducted concurrently with the intake of high-fat diet persist 9 weeks after the last exercise session, preventing glucose intolerance along with reduction in the expression of inflammatory cytokines sites.

Key Words: Exercise; Detraining; Glucose Tolerance, Hyperlipidic Diet; *Tnf*, *Slc2a4*.

Introdução

A obesidade, em particular o excesso de adiposidade visceral vem sendo fortemente associada à resistência insulínica, hipertensão e dislipidemia, colaborando para as elevadas taxas de mortalidade e morbidade em humanos, o estado de inflamação crônica ocasionado pela obesidade exerce um papel crucial na patogênese metabólica do diabetes do tipo 2 [1;2].

A produção de adipocinas se encontra positivamente regulada na obesidade, e o aumento na expressão de citocinas inflamatórias como o TNF- α no tecido muscular tem sido fortemente correlacionado com a diminuição na sensibilidade à insulina [4]. A supressão e/ou superexpressão de genes correlacionados com inflamação em modelos animais, tais como TNF- α , TNFR1 / 2, JNK, TLR2, IKK ϵ , e outros, demonstram efeitos metabólicos benéficos da na redução ou falta dos respectivos mediadores inflamatórios. [5–11].

Hoje, sabe-se que a atividade física aumenta a sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal, e o principal efeito do exercício parece ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular do transportador de glicose 4 (GLUT4) na musculatura esquelética [12; 13; 14]

Quando executada de maneira intensa e crônica, o exercício físico leva ao aumento na atividade de enzimas mitocondriais e melhora no desempenho durante atividades que dependem do metabolismo aeróbio, bem como incrementa conteúdo de proteínas associadas ao transporte e oxidação de glicose e ácidos graxos como o Pgc1 α . [15; 16]

Entretanto, a interrupção do treinamento é acompanhada por uma redução na expressão de proteínas chave da cascata de sinalização da insulina, bem como na concentração de GLUT4, assim como ocorre redução na sensibilidade à ação da insulina [17], e também um aumento das concentrações de Tnf- α associado à elevada ingestão de lipídios [18]. Tais alterações ocorrem poucos dias após a última sessão de exercício. O mesmo ocorre com a expressão de Pgc1 α que retorna a quantidades pré-treinamento [19].

Apesar da relação entre o processo de destreinamento com o desenvolvimento da obesidade [20,21, 22], a maioria dos estudos se baseia no destreinamento por curtos períodos [17,18,23]. Um período maior de destreinamento pode implicar em alterações no metabolismo, sobretudo quando não há uma dieta equilibrada, como no caso de dieta hiperlipídica [24].

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de nove semanas de destreinamento sobre a expressão local de citocina pró-inflamatória e proteínas-chaves no metabolismo glicídico em músculo oxidativo de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica e ao treinamento intermitente de alta intensidade.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar adultos (60 dias) foram mantidos no biotério de experimentação na Universidade de origem, em gaiolas coletivas, não excedendo cinco animais por gaiola, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ controlados. Os animais controles (C, CE, CD) foram alimentados com ração padrão (Supra Lab – Alisul Ind. Alimentos LTDA., São Leopoldo, RS) e água *ad libitum*. Aos grupos obesos (O, OE, OD), foi ofertada

uma dieta hiperlipídica (dieta de cafeteria), utilizada por nosso grupo em estudos anteriores [26; 27] composta por: bacon, mortadela, salsicha, bolacha, refrigerante e ração padrão. A dieta foi mantida em ambas as fases do estudo (treinamento e destreinamento). Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP – Campus Presidente Prudente, processo nº 04/2011.

Desenho experimental

Os animais foram adaptados ao modelo de exercício uma semana antes do início do protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade [25]. A adaptação consistiu na realização de três sessões sem incremento de carga; composta de uma, duas e três séries de 12 repetições do primeiro ao terceiro dia respectivamente, com intervalo de 24 horas entre cada sessão (CE; OE; CD; OD).

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

O protocolo de treinamento consistiu em três sessões semanais, intervaladas por 24 horas, sendo que cada sessão consistiu na realização de três séries de 12 repetições com intervalos de 60 s entre cada série. O treinamento se iniciou juntamente com a dieta hiperlipídica, quando os animais atingiram a idade jovem adulta, aos três meses de idade.

Destreinamento

Ao final da nona semana de treinamento parte dos animais foram

sacrificados e o remanescente foi submetido ao destreinoamento que consistiu na interrupção do treinamento e manutenção da dieta por nove semanas subsequentes (CD;OD).

Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (TTG)

O teste foi realizado em 2 momentos, ao final do protocolo de treinamento e ao final do destreinoamento. Após ficarem 8 horas de jejum [26], administrou-se 1,5 g glicose/Kg do peso corpóreo, via intraperitoneal, em solução a 20% de glicose em salina 0,9%. Foi coletada uma amostra de sangue antes da aplicação de glicose (tempo zero) e a 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. Para a coleta de sangue foi realizada uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal e a glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda. / MG - Brasil).

Coleta do material

Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais foram submetidos a 12 horas de jejum e foram sacrificados após anestesia (Xilasina e Quetamina – dose de 60 mg/kg do peso corporal de cada componente) por via intraperitoneal. Em seguida, foram retirados o músculo sóleo e o tecido adiposo branco periepididimal (TA).

Quantificação do RNAm dos genes *Slc2a4*, *Tnf*, *Pgc1a* e do *Gapdh*:

Para a quantificação do RNAm dos genes foi utilizada a técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*).

O RNA total das amostras do músculo sóleo foi isolado com Brazol

(LGCBio Biotecnologia, Brasil), segundo as recomendações do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas pela absorvância a 260 nm. A pureza do RNA foi determinada mediante o cálculo da relação de absorvância a 260 e 280 nm, bem como por coloração por brometo de etídio. Para transcrição reversa, 5 µg de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa com primers randômicos para a síntese de uma fita de DNA complementar ao mRNA (cDNA). Posteriormente, foi realizada a amplificação dos fragmentos dos genes para *Slc2a4* (Sense: 5'- CCCCTCCAGGGCAAAGGAT -3'; Antisense: 5'- TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3'); *Tnf* (Sense: 5'- CCCCTCCAGGGCAAAGGAT -3'; Antisense: 5'- TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3')), *Pgc-1α* (Sense:5'-AAGACTATTGAGCGAACCT-3' e Antisense:5'- TTGGAATTGACTGACTGACA-3'), e da *Gapdh* (Sense: 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3'; Antisense: 5' - GAAGATGGTGATGGGATTTTC - 3'); por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR). Os produtos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose (EtBr) e visualizados com iluminação UV (Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc.). Para a análise densitométrica das bandas obtidas, utilizou-se o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para esse fim. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão da proteína desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH - Sense: 5'- AAGACTATTGAGCGAACCTT-3' e Antisense:5'-TTGGAATTGACTGACTGACA-3').

. As incubações foram realizadas em termociclador automático Techne TC-312.

A expressão do RNAm, foi normalizada pela expressão do *Gapdh* (proteína constitutiva), calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo.

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi confirmada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos valores de peso corporal, depuração da glicose (TTG), dados morfométricos, expressão gênica e proteica utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA – One Way) para medidas repetidas, seguida, quando necessário, de pós-teste de Tukey. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para $P < 0,05$.

Resultados

Na Tabela 1 são apresentadas as características de peso tecidual, corpóreo e glicemia dos animais ao final do período de treinamento e ao final do período de destreino. Nota-se, no período de nove semanas, que a dieta hiperlipídica (O) ocasionou um aumento (44,8%; $P < 0,001$) no percentual de ganho corpóreo comparado ao grupo C (25,8%), e dobrou de valor (59,1%, $P < 0,001$) ao final das dezoito semanas de tratamento comparado ao grupo C7 (27%). Quando avaliado o exercício + dieta, em nove semanas, verificamos um ganho menor no percentual de peso corpóreo (24%, $P < 0,001$) quando comparado ao grupo O (44%), equiparando-se ao grupo C (25,8%). Por outro lado, o destreino ocasionou um ganho (53,3%) mais rápido de peso corpóreo, se comparado aos grupos controles de mesma idade (C7 = 27,9% e CD=23,3%, $P < 0,001$), equiparando ao grupo O7 (59,9%).

As diferenças no ganho de peso corpóreo refletiram diretamente na quantidade relativa de tecido adiposo periepídimal dos animais (Tabela 1). Em nove semanas de intervenção, o grupo O apresentou uma adiposidade relativa 88% ($P < 0,001$) maior que o grupo C, obtendo 113% ($P < 0,001$) ao final das dezoito semanas de tratamento, se comparados aos controles de mesma idade (O7 vs C7). O exercício + dieta (grupo OE) foi capaz de reduzir em aproximadamente 58% o excesso de adiposidade relativa ($P < 0,05$ vs O7), porém o destreinamento reverteu esta situação, deixando os grupos O7 e OD com percentuais semelhantes.

Em nove semanas, a dieta hiperlipídica (O) provocou um aumento de 28% na glicemia de jejum (Tabela 1), quando comparado ao grupo C, porém o treinamento foi capaz de diminuir ainda mais (41%) a glicemia, como observado no grupo CE, e em 15% no grupo dieta + exercício (OE) ao final do protocolo de treinamento. Quando avaliados, ao final do período de destreinamento, os animais que tiveram a interrupção do exercício por nove semanas (CD; OD) mantiveram a glicemia de jejum reduzida quando comparados aos animais submetidos apenas a dieta (O7) (Tabela 1).

Inserir tabela1

Em nove semanas, a dieta (grupo O) não foi eficaz em reduzir a depuração da glicose (Figura 1) quando comparado ao controle (C), porém quando confrontados aos grupos exercitados, nota-se melhor tolerância à sobrecarga glicídica nos animais treinados (CE 15%; OE 53%), comparados ao grupo Obeso (O). Quando observado ao final do período de destreinamento, os

animais CD e OD mantiveram a tolerância à glicose aumentada em 143%, e 85% quando comparado aos animais O7 (Figura 1).

Inserir figura 1

Em relação à expressão de RNAm do *Tnf* (figura 2) no músculo esquelético oxidativo solear, o grupo O apresentou uma elevação de 64% ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo C, e o exercício foi capaz de mantê-lo reduzido, independente da dieta (CE= - 61%; OE= - 41%) quando comparado ao grupo O ($P < 0,001$ vs CE; $P < 0,05$ vs OE). Ao analisar a expressão no final do período de destreino, os animais CD e OD mantiveram os valores reduzidos de RNAm do *Tnf* em 40% e 38% ($P < 0,05$), em relação aos animais C7 e 84% e 81%, respectivamente, quando comparado aos animais O7 ($P < 0,01$).

Inserir Figura 2

Ao analisar a expressão de RNAm do gene *Slc2a4* na figura 3, a única diferença observada ocorreu nos animais submetidos ao treinamento físico, nos quais, logo após protocolo de treinamento (CE), observou-se aumento na expressão em 74% ($P < 0,001$) quando comparado ao controle (C), mantendo-se elevado (39%, $P < 0,005$) após nove semanas de destreino (CD), se comparado ao controle de mesma idade (C7).

Inserir figura 3

Sobre a expressão gênica do *Pgc1a* (figura 4) na musculatura solear, a dieta (grupo O) foi eficaz em reduzir em 29% ($P < 0,05$) quando comparado aos controles (C), chegando a 32% ($P < 0,05$), com 18 semanas de oferta da dieta comparado com os controles de mesma idade (O7 vs C7). O protocolo de

exercício foi eficaz em aumentar a expressão de *Pgc1a* em 49% no grupo CE ($P<0,05$) e 46% no grupo OE ($P<0,05$), quando comparado ao grupo C, e 111% e 107% ($P<0,001$), respectivamente, quando comparado ao grupo O. Ao analisar o período de destreinamento, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos destreinados e controles.

Inserir figura 4

Discussão

O ganho de peso e a obesidade estão entre os fatores de riscos biológicos mais potentes para o desenvolvimento de patologias idade-relacionadas comparado a indivíduos eutróficos. A obesidade e seus estados metabólicos associados, reduzem a expectativa de vida útil de 5 a 20 anos, em média (28).

No presente estudo, nota-se que a dieta hiperlipídica por curto período como nove semanas (O), se mostra eficaz em promover maior percentual de ganho corpóreo frente à dieta equilibrada da ração padrão ($p<0,001$ vs C). A redução na adiposidade utilizando o exercício como intervenção terapêutica em modelos obesos experimentais já está bem evidenciada na literatura, porém em sua grande maioria os estudos se concentram em indivíduos já obesos (24,26, 27), e sem acompanhar o período pós-interrupção em médio ou em longo prazo, onde reside o diferencial deste estudo, no qual se investiga o efeito do exercício e dieta simultaneamente com o período de cessação do exercício. Assim, foi avaliado o efeito do treinamento físico paralelo à ingestão de dieta hiperlipídica e hipercalórica, com a prerrogativa de se verificar se o treinamento físico de alta intensidade seria uma ferramenta útil em evitar ganho de massa corpórea e de massa adiposa.

Quando a dieta foi imposta associada ao treinamento físico observou-se menor ganho corpóreo ($p < 0,001$ vs OE) evidenciando que a prática foi uma ferramenta importante no controle do peso corpóreo ao atenuar o ganho de massa corpórea e adiposa em indivíduos alimentados com dieta hiperlipídica. Porém, com o sobrestar da atividade, a manutenção dos benefícios no controle corporal passa a depender da constituição da dieta do indivíduo em questão. Em nosso estudo, apesar do destreinamento não variar quanto ao ganho de peso (C7 vs CD), foi capaz de sustentar a diferença da massa adiposa relativa dos animais submetidos à dieta padrão (C7 vs CD, $p < 0,01$), o que isso não se repete quando ministrada uma dieta hiperlipídica (O7 vs OD).

Sobre a expressão do gene *Slc2a4*, como encontrado na literatura (28, 29, 30), o exercício foi eficaz em aumentar a quantidade de RNAm no músculo oxidativo dos animais submetidos ao treinamento (CE)(Fig. 3), porém o mesmo não ocorreu com os animais que receberam o combinado dieta + exercício (OE), mostrando um possível efeito da dieta em atenuar ou impedir este ganho. Entretanto os animais submetidos unicamente à dieta não apresentaram prejuízos na expressão do *Slc2a4* (O, O7) (Fig. 3), sugerindo que a menor tolerância à glicose, evidenciada no TTG (Fig. 1), independe da quantidade de RNAm do *Slc2a4*. Evidentemente deve se considerar que os resultados aqui encontrados para quantidade de RNAm podem não refletir diretamente no conteúdo de proteína GLUT4 no músculo estudado [31], o que foge ao escopo do presente estudo.

Existe uma forte associação entre a prática de atividade física e a redução do processo inflamatório decorrente da obesidade [33-37]. Em concordância com essas observações, nossos resultados mostram que a expressão de RNAm

de *Tnf* aumentou em músculo esquelético de ratos submetidos à dieta hiperlipídica (O, O7) (Fig. 2) de maneira significativa. Uma das vias pela qual o *Tnf* induz a resistência à insulina é o estímulo da lipólise no tecido adiposo, gerando aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, que eventualmente contribui para o desenvolvimento desse fenótipo resistente à insulina [38].

Um dado interessante das conclusões deste estudo ocorre quando foram avaliados os animais após o destreino, no qual os animais destreinados mantiveram os valores reduzidos de *Tnf* (Fig. 2) e elevada tolerância à glicose, quando comparados aos seus respectivos controles. Nove semanas de dieta foram eficazes em reduzir a tolerância à glicose (O), entretanto, nos animais que receberam dieta e foram destreinados (OD) não foi observada redução similar na tolerância à glicose (Fig. 1). A redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias no músculo sóleo pode justificar a melhora da tolerância à glicose nos animais submetidos ao treinamento e à dieta hiperlipídica, redução que pode estar associada com aumento da sensibilidade à insulina no músculo e no tecido adiposo encontrado em outros estudos [13,14, 39, 40].

Essa resposta ao treinamento pode ter sido promovida por adaptações positivas na capacidade oxidativa do músculo. Foi avaliada a expressão do gene do *Pgc1a*, a qual se mostrou ampliada nos animais que passaram pelo treinamento (CE, OE), sugerindo que pode ter ocorrido um aumento na metabolização de lipídios, reduzindo ou limitando os fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Fig. 2), melhorando a tolerância à glicose. Este efeito perdurou durante nove semanas após a última sessão de treinamento (CD) com a manutenção da dieta equilibrada. O mesmo não ocorreu ao grupo submetido

ao combinado dieta+exercício (OE), que ao final do período de destreinamento (OD) apresentou resultados similares aos grupos submetidos à dieta por 18 semanas (O7).

Diante dos resultados encontrados, parece que o destreinamento está associado às mudanças moleculares que favorecem o acúmulo de energia (redução da expressão *Pgc1a*), colaborando com o ganho de peso e aumento de tecido adiposo, modulado pelo padrão alimentar. Entretanto as alterações na tolerância à glicose, juntamente com a expressão do *Tnf*, perduram após nove semanas da última sessão de treinamento, independente da dieta adotada, sugerindo um fator protetor frente à inflamação ocasionada pela dieta hiperlipídica.

Concluindo, pode-se sugerir que o treinamento físico, realizado simultaneamente à ingestão de dieta hiperlipídica, foi eficaz em prevenir inflamação local, melhorar a expressão de gene ligado ao controle de oxidação lipídica e evitar intolerância à glicose. O destreinamento de nove semanas em animais obesos parece prevenir inflamação local e intolerância à glicose, porém remete ao prejuízo da expressão de gene ligado à oxidação lipídica.

Referencias

1. HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. ***Nature*** 444, 860–867 (2006).
2. SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. ***J. Clin. Invest.*** 116, 1793–1801 (2006).

3. HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science** 259, 87–91 (1993).
4. SAGHIZADEH M, ONG JM, GARVEY WT, HENRY RR, KERN PA. 1996. The expression of TNF α by human muscle. Relationship to insulin resistance. **J. Clin. Investig.** 97:1111–16.
5. UYSALKT, WIESBROCK SM, MARINOMW, HOTAMISLIGIL GS. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature** 389:610–1437.
6. HIROSUMI J, TUNCMAN G, CHANG L, GORGUN CZ, UYSAL KT, et al. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature** 420:333–36.
7. HIMES RW, SMITH CW. 2010. *Tlr2* is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. **FASEB J.** 24:731–39.
8. CHIANG SH, BAZUINE M, LUMENG CN, GELETKA LM, MOWERS J, ET AL. 2009. The protein kinase IKK ϵ regulates energy balance in obese mice. **Cell** 138:961–75.
9. UYSAL KT, WIESBROCK SM, HOTAMISLIGIL GS. 1998. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. **Endocrinology** 139:4832–38.
10. HOTAMISLIGIL, G. S., BUDAVARI, A., MURRAY, D. & SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . **J. Clin. Invest.** 94, 1543–1549 (1994).

11. UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature** 389, 610–614 (1997).

12. 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. **Eur J Endocrinol** 147, 149-157.

13. O'DONOVAN, G., KEARNEY, E. M., NEVILL, A. M., WOOLF-MAY, K. & BIRD, S. R. (2005). The effects of 24 weeks of moderate- or high-intensity exercise on insulin resistance. **Eur J Appl Physiol** 95, 522-528.

14. TERAN-GARCIA, M., RANKINEN, T., KOZA, R. A., RAO, D. C. & BOUCHARD, C. (2005). Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 288, E1168-1178.

15. GIBALA M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**.2009;34:428–432

16. LITTLE, JONATHAN P; ADEEL S. SAFDAR, GEOFFREY P. WILKIN, MARK A. TARNOPOLSKY, AND MARTIN J. GIBALA (2009). "A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms". **Journal of Physiology** 588 (Pt 6): 1011–22.

17. KUMP DS & BOOTH FW (2005). Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol** 562, 829–838.

18. GILL JM, CASLAKE MJ, MCALLISTER C, TSOFLIOU F, FERRELL WR, PACKARD CJ, MALKOVA D. Effects of short-term detraining on

postprandial metabolism, endothelial function, and inflammation in endurance-trained men: dissociation between changes in triglyceride metabolism and endothelial function. **J Clin Endocrinol Metab** 88: 4328–35, 2003.

19. PILEGAARD, H., SALTIN, B. & NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 546, 851–858 (2003).

20. TOSHITAKE MITSUHASHI, CHIZUMI YAMADA, AKO IIDA, NOBORU HIRATSUKA, FUMIYO INABE, NAMI ARAIDA, KENGO MORIYAMA, HITOSHI SASAMORI, NORIO SASAMORI, MOTOHIKO MIYACHI AND EIKO TAKAHASHI. Long-term Detraining Increases the Risk of Metabolic Syndrome in Japanese Men. **Tokai J Exp Chlin Med.**, Vol. 36, No. 4, pp. 95-99, 2011.

21. PETIBOIS C, CASSAIGNE A, GIN H, DÉLÉRIS G. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, 2004; 89: 3377-84.

22. WILLIAMS PT, THOMPSON PD. Dose-dependent effects of training and detraining on weight in 6406 runners during 7.4 years. **Obesity (Silver Spring)** 2006; 14: 1975-84

23. PERES, S. B., DE MORAES, S. M., COSTA, C. E., BRITO, L. C., TAKADA, J., ANDREOTTI, S., MACHADO, M. A., ALONSO-VALE, M. I., BORGES-SILVA, C. N. & LIMA, F. B. (2005). Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **J Appl Physiol** 98, 1037-1043.

24. PAULI, J. R. ; CINTRA, D. E. ; ROPELLE, E. R. ; SOUZA, C. T. ; SAAD, M. J. . Mecanismos moleculares de indução de obesidade e resistência à insulina em animais destreinados submetidos a uma dieta rica em lipídes.. **Motriz (Rio Claro)**, v. 13, p. 19-28, 2007.

25. PANVELOSKI-COSTA, A. C. ; PAPOTI, M. ; MOREIRA, R. J. ; SERAPHIM, P. M. . Respostas lactacidêmicas de ratos ao treinamento intermitente de alta intensidade. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte (Impresso)*, v. 18, p. 122-125, 2012.

26. PINTO JUNIOR, D. A. C. ; SERAPHIM, P. M. . Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in wistar rats. **Revista de Nutrição (Impresso)**, v. 25, p. 313-319, 2012.

27. COSTA, A. C. P. ; PINTO JUNIOR, D. A. C. ; BRANDAO, B. B. ; MOREIRA, R. J. ; MACHADO, Ubiratan Fabres ; SERAPHIM, P. M. . O treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Impresso)**, v. 55, p. 140-148, 2011.

28. OLSHANSKY SJ, PASSARO DJ, HERSHOW RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. **N Engl J Med**, n.352, p.1138-1145, 2005.

29. ROSE AJ. and RICHTER EA. Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulate? **Physiology**, 2005; 20:260-270.

30. HOUMARD JA, SHINEBARGER MH, DOLAN PL ET AL. (1993) Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. **Am J Physiol** 264:E896–E901

31. SERAPHIM, P. M. ; NUNES, M. T. ; GIANOCCO, G. ; MACHADO, Ubiratan Fabres . Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology (Print)**, v. 276, p. 80-87, 2007.

32. KANETY H, FEINSTEIN R, PAPA MZ, HEMI R, KARASIK A (1995) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor

substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem** 270:23780– 23784

33. HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, SPIEGELMAN BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. **Science** 271:665–668

34. KAHN, BB (1996) Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. **Diabetes** 45:1644–1654

35. HANDSCHIN C, SPIEGELMAN BM. The role of exercise and PGC-1 in inflammation and chronic disease. **Nature**. 2008;454:463-9.

36. WAKI H, TONTONOZ P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu Rev Pathol Mech Dis**. 2007;2:31-56.

37. TSUKUMO DM, CARVALHO-FILHO MA, CARVALHEIRA JB, PRADA PO, HIRABARA SM, SCHENKA AA. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced and insulin resistance. **Diabetes**. 2007;56(8):1986-8.

38. SAVAGE DB, PETERSEN KF, SHULMAN GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol Rev**. 2007;87(2):507-520.

39. MILANSKI M, DEGASPERI G, COOPE A, MORARI J, DENIS R, CINTRA DE. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**. 2009;29(2):359-70.

40. Popa C, Netea MG, Van Riel PLCM, Van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **J Lipid Res**. 2007;48:751-62.

41. KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **J. Clin. Invest.** 95, 2111–2119 (1995).

42. ZICCARDI, P. et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation** 105, 804–809 (2002).

Anexos

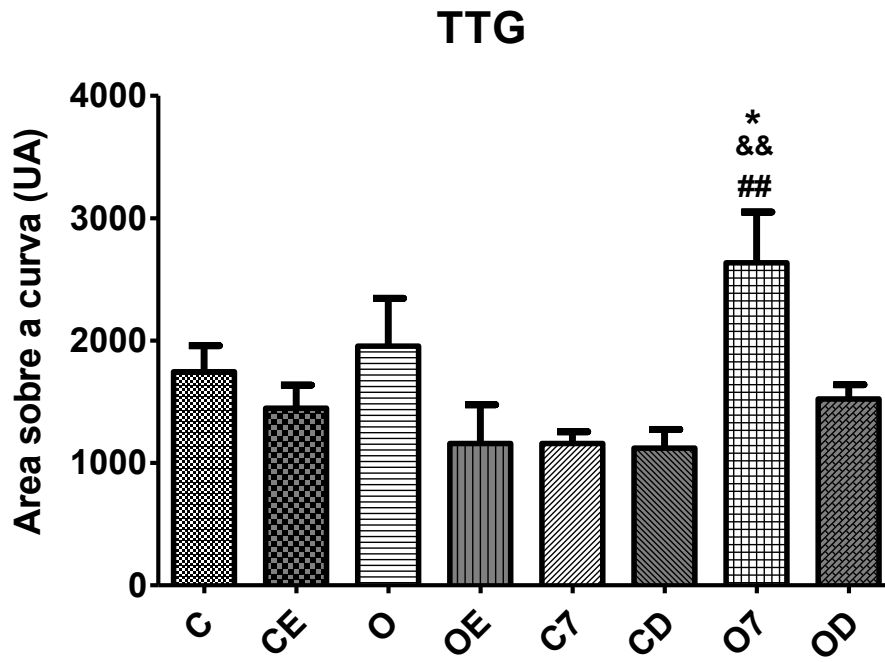
Tabelas

Tabela1. Percentual de ganho de peso corpóreo, Peso relativo de tecidos e glicemia dos animais: Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (O), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD).

Grupos	Percentual de Ganho de Peso corpóreo	Peso Relativo Tecido Adiposo (x10 ³ g / PC)	Peso Relativo Sóleo (10 ³ g /PC)	Glicemia de jejum no dia do sacrifício mg/dL
C	25,8± 8,6 ^A	11,70±3,89 ^A	0,47±0,062	87,2± 7,08
CE	16,1± 2,9	5,86±1,10	0,48±0,077	78,9± 9,21
O	44,8± 5,2 ^{BCDEF}	22,11±3,17 ^{BCEFI}	0,48±0,076	112± 8,86 ^{BCFL}
OE	24,5± 4,8 ^A	13,94±3,87 ^{AJ}	0,47±0,086	97,4± 9,82 ^C
C7	27,9± 5,2 ^A	11,37±2,64 ^{AJ}	0,49±0,064	99,2± 5,63
CD	23,3± 1,8 ^A	6,00±1,02	0,54±0,051 ^N	92,7± 8,82
O7	59,1± 1,5 ^{BCDEFG}	23,72±4,80 ^{BCDEF}	0,42±0,071	116± 8,75 ^{BCDEF}
OD	53,3± 5,2 ^{BCDEFH}	19,67±6,24 ^{BCFILM}	0,46±0,097	106,7± 6,14 ^{BCF}

Figuras

Figura1



.Figura2

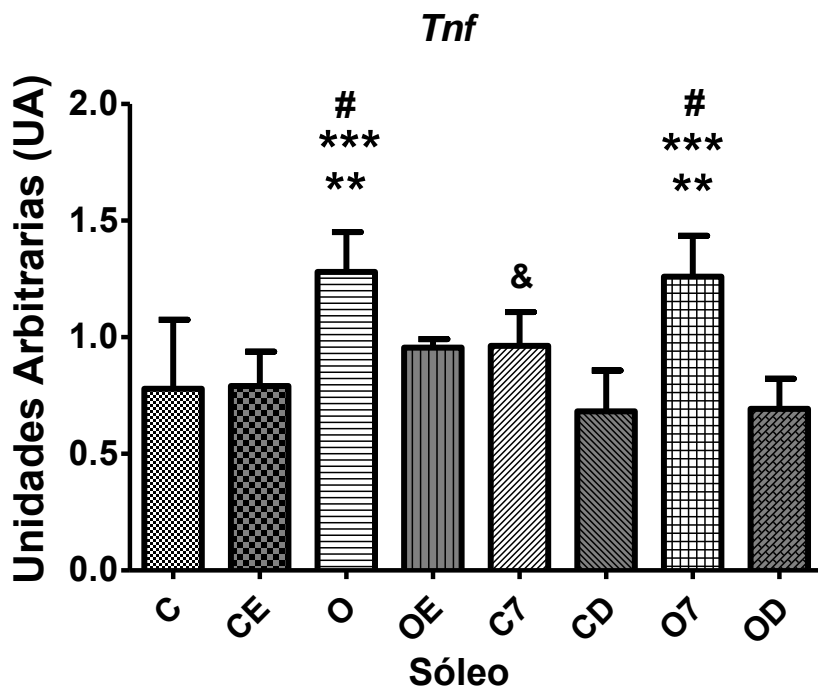


Figura3

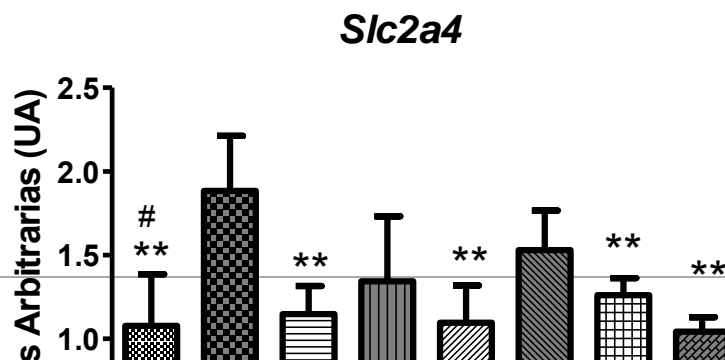
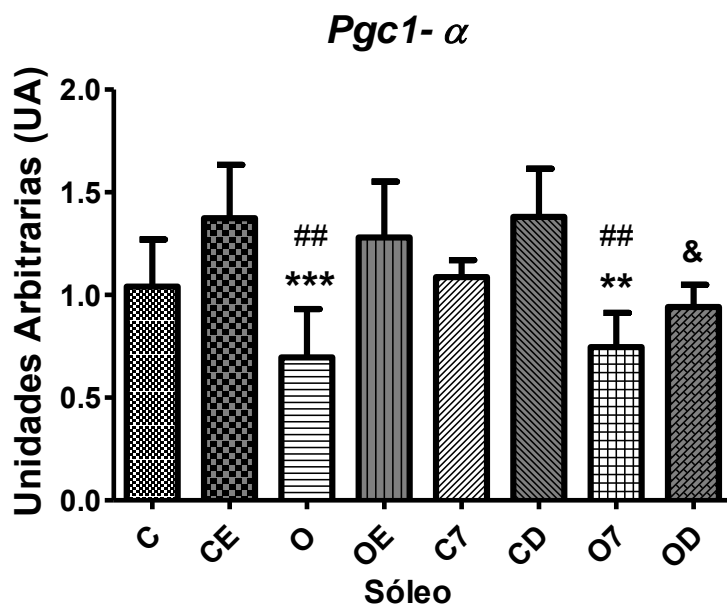


Figura4



Legenda das tabelas

Valores expressos em média \pm desvio padrão. (n= 7 a 10 animais por grupo): ^A P<0,01 VS CE; ^B P<0,001 VS C; ^C P<0,001 VS CE; ^D P<0,001 VS OE; ^E P<0,001 VS C7; ^F P< 0,001 VS CD; ^G P< 0,01 VS O; ^H P< 0,05 VS O; ^I P< 0,01 VS OE; ^J P< 0,01 VS CD; ^L P<0,05 VS OE; ^M P<0,01 VS C7; ^N P<0,05 VS O7;

Legenda das figuras

Figura 1. Gráfico representativo do TTG ao final do protocolo de treinamento e ao final período de destreino (n= 5 a 8 animais por grupo): Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreino (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreino (OD). *P< 0,05 vs OD, ##P< 0,001 vs C7 e CD, &&P<0,01 vs CE e OE.

Figura 2. Gráfico representativo ao final do protocolo de treinamento e ao final período de destreino do conteúdo de RNAm de *Tnf* corrigidos pelo gene constitutivo *Gapdh* na musculatura solear, expressos em unidades arbitrárias (n= 5 a 8 animais por grupo): Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). #P< 0,05 vs OE E C7, **P< 0,001 vs C e CE, ***P<0,01 vs CD e OD,). &P< 0,05 vs CD e OD

Figura 3. Gráfico representativo ao final do protocolo de treinamento e ao final período de destreino do conteúdo de RNAm de *Slc2a4* corrigidos pelo gene constitutivo *Gapdh* na musculatura solear, expressos em unidades arbitrárias (n= 5 a 7 animais por grupo): Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). **P< 0,01 vs CE, #< 0,05 vs CD

Figura 4. Gráfico representativo ao final do protocolo de treinamento e ao final período de destreino do conteúdo de RNAm de *PGC1- α* corrigidos pelo gene constitutivo *Gapdh* na musculatura solear, expressos em unidades arbitrárias (n= 5 a 7 animais por grupo): Controle Sedentário (C), Controle Exercício (CE), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercício (OE), Controle 7 meses (C7) Controle Exercitado Destreinado (CD), Obeso 7 meses (O7) e Obeso Exercitado Destreinado (OD). ***P< 0,001 vs CE e OE, **P< 0,01 vs CE e OE,##P<0,001 vs CD, &P< 0,05 vs CE e CD.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, FN et al. A Resposta do Peso e da Composição Corporal a Inclusão da Dieta de Cafeteria e Treinamento Físico Aeróbio em Diferentes Fases do Desenvolvimento, **Cienc Cuid Saúde**, v.7, Suplem. 1, p. 39-44, 2008.

ANWAY MD, CUPP AS, UZUMCU M, SKINNER MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**; n.308, p.1466–1469, 2005.

BARRE` S, ROMAIN; YAN JIE; EGAN BRENDAN;, et al. Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**, n.15, p.405–411, 2012

AUGUSTIN, ROBERT. The Protein Family of Glucose Transport Facilitators: It's Not Only About Glucose After All. **IUBMB Life**, v.5, n.62, p. 315–333, 2010.

BERNARDES, D et al. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos, **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.**, v.18,n.2, p.191-200, 2004.

BRAY GA. The missing link - lose weight, live longer. **N Engl J Med**, n.357. p.818-820, 2007.

CARROLL, S.; DUDFIELD, M. What is the relationship between exercise end metabolic abnormalities? A review of the metabolic syndrome. **Sports Med, Leeds**, V. 346, p. 371- 418, 2004.

CIOLAC, E.; GUIMARÃES, G. Síndrome metabólica: abordagem do educador físico. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 14, 4, p. 659 – 670, julho, 2004.

CLOUAIRE T, STANCHEVA I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? **Cell Mol Life Sci**, n.65, p.1509–1522, 2008.

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

EGUCHI, R et al. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta, **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 3, 2008.

EVERITT AV, LE COUTEUR DG. Life extension by calorie restriction in humans. **Ann N Y Acad Sci**, n.1114, p.428-433, 2007

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

FROSIG, C. et al. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2093-102, 2007.

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

GUTIERRES, A.; MARINS, J. Os efeitos do treinamento de força sobre os fatores de risco da síndrome metabólica. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 11, 1, p. 147 – 158, 2008.

GUARENTE LP, PATRIDGE L, WALLACE DC. Molecular Biology of Aging. New York, Cold Springs Harbor, 2008

GUYTON, A.C., HALL, J.E Tratado De Fisiologia Médica 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002

HAMILTON MT, HAMILTON DG, ZDERIC TW. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. **Diabetes**, n.56, p.2655-2667, 2007.

HENNINGSSEN, J., RIGBOLT, K. T., BLAGOEV, B., PEDERSEN, B. K. and KRATCHMAROVA, I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. **Mol. Cell. Proteomics**, n.9, p. 2482-2496, 2010.

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

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

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. v 259, 59: 87–91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 24, n. 4, p. 23–27, 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity–diabetes link. **Diabetes** v. 43, p. 1271–1278, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature** n.444, p. 860–867, 2006.

HU FB, WILLETT WC, LI T, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, MANSON JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. **N Engl J Med**, n.351, p. 2694-2703, 2004.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1>. Acessado em 08.08.11

KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol**, v. 562, n. Pt 3, p. 829-838, 2005.

KAWANISHI, N., YANO, H., YOKOGAWA, Y. & SUZUKI, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc. Immunol. Rev.** 16, p.105–118, 2010.

KANDA, H. ET AL. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J. Clin. Invest.** n.116, , p.1494–1505, 2006.

KRAUS, W. E. et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med**; n.347, p. 1483–1492, 2002.

KARAGOUNIS LG, YASPELKIS BB, REEDER DW, LANCASTER GI, HAWLEY JA, COFFEY VG. Contraction-induced changes in TNF- α and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol** n.109, p. 839-48, 2010.

LAMAS, O; MARTÁNEZ, J. A.; MARTI, A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. **The Journal of nutritional biochemistry.** v. 15, n. 7, p. 418-25, 2004.

LARA-CASTRO C, NEWCOMER BR, ROWELL J, WALLACE P, SHAUGHNESSY SM, et al.. Effects of short-term very low-calorie diet on intramyocellular lipid and insulin sensitivity in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, n.57, p.1–8, 2008.

LAROCCA TJ, SEALS DR, PIERCE GL. Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity. **Mech Ageing Dev**, n.131, p.165-167, 2010.

LEONARD, B. E. Inflammation, depression and dementia: are they connected? **Neurochem. Res**;n.32, p.1749–1756, 2007.

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

Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D., Danaei G., Shibuya K., Adair-Rohani H., Amann M., (...), Ezzati M. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 **The Lancet**, 380 (9859) , pp. 2224-2260, 2012.

LIMA, Cd.; ALVES, L. E.; LAGHER, F.; MACHADO, A. F.; BONATTO, S. J.; KUCZERA, D. et al. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. **European Journal of Applied Physiology**, v.104, p.8. 2008

LING, CHARLOTTE, and GROOP, LEIF. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, vol. 58, 2009.

LUMENG, C. N., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J. Clin. Invest.** n.117, p. 175–184, 2007.

MACHADO, U. F., et al. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n. 2, 2006.

MATHUR, M. & PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade inflammation. **Mediators Inflamm.** n.109,p.502, 2008.

MATTISON JA, ROTH GS, BEASLEY TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. **Nature**, n.489, p.318-321, p. 2012;

MAXWELL, M.; GOSLIN, B.; GELLISH, R.; HIGHTOWER, K.; OLSON, R.; MOUDGIL, V.; RUSSI, G.. Metabolic syndrome status changes with fitness level

change: a retrospective analysis. *Metabolic syndrome and related disorders. Michigan*, v. 6, 1, p. 8- 14, 2008.

MILANSKI M, DEGASPERI G, COOPE A, MORARI J, DENIS R, CINTRA DE. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**.v.29, n.2, p.359-370, 2009.

MEIRELLES, C.; GOMES, S. Efeitos agudos da atividade contra resistência sobre o gasto energético: revisando o impacto sobre as principais variáveis. **Rev Bras Med Esporte.**, Rio de Janeiro, v. 10, 2, p. 122- 130, março/ abril,2004.

MMWR. **Recommendations and Reports**, v. 58, n. 27, p. 740-744, 2009.

OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. & WALSK, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Rev. Immunol.** n.11,p.85–97 ,2011.

OLSHANSKY SJ, PASSARO DJ, HERSHOW RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. **N Engl J Med**, n.352, p.1138-1145, 2005.

PANVELOSKI-COSTA AC, PINTO JÚNIOR DA, BRANDÃO BB, MOREIRA RJ, MACHADO UF, SERAPHIM PM. Resistive training reduces inflammation in skeletal muscle and improves the peripheral insulin sensitivity in obese rats induced by hyperlipidic diet. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, n.55, p.155-163, 2011.

PRADO, E.; DANTAS, E. Efeitos dos exercícios físicos aeróbio e de força nas lipoproteínas HDL, LDL e Lipoproteína. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 79, 4, p. 429- 433, 2002.

PERES, S. B., DE MORAES, S. M., COSTA, C. E., BRITO, L. C., TAKADA, J., ANDREOTTI, S., MACHADO, M. A., ALONSO-VALE, M. I., BORGES-SILVA, C. N. & LIMA, F. B. Endurance exercise training increases insulin responsiveness

in isolated adipocytes through IRS/PI3- kinase/Akt pathway. **J Appl Physiol**, n.98, p.1037-1043, 2005.

PETIBOIS, C. et al. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 7, p. 3377-84, 2004.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, 2005.

PETERSEN, K. F., DUFOUR, S., BEFROY, D., GARCIA, R. & SHULMAN, G. I.. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, n.350, p.664-671, 2004.

PINTO JUNIOR, D. A. C. ; SERAPHIM, P. M. . CAFETERIA DIET INTAKE FOR FOURTEEN WEEKS CAN CAUSE OBESITY AND INSULIN RESISTANCE IN WISTAR RATS. **Revista de Nutrição (Impresso)**, v. 25, p. 313-319, 2012.

POPA C, NETEA MG, VAN RIEL PLCM, VAN DER MEER JWM, STALENHOF AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **J Lipid Res** n.48, p. 751-62, 2007.

PUTERMAN E, LIN J, BLACKBURN E, O'DONOVAN A, ADLER N, EPEL E. The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length. **PLoS ONE** ,n.5, p.e 10837 , 2010.

ROOK, G. A. & DALGLEISH, A. Infection, immunoregulation, and cancer. **Immunol. Rev.** n.240, p.141–159, 2011.

SATTELMAIR JR, PERTMAN JH, FORMAN DE. Effects of physical activity on cardiovascular and noncardiovascular outcomes in older adults. **Clin Geriatr Med**, n.25, p.677-702, 2009.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B., KOOI, M. E., HESSELINK, M. K., JENESON, J. A., BACKES, et al. Impaired in vivo mitochondrial function but

similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. **Diabetologia** 50, 113-120, 2007.

SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.** n.116, p. 1793–1801, 2006.

SILVEIRA, MR. Correlação entre Índice de Massa Corporal e Concentração Plasmática de Adipocinas em Mulheres Sedentárias. **Dissertação de Mestrado**, Piracicaba, 2008.

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

TALANIAN, J.L.; GALLOWAY, S.D.R.; HEIGENHAUSER, G.J.F; BONEN, A.; SPRIET, L.L. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity of fat oxidation during exercise in women. **J Appl Physiol**, v. 102, p. 1439-1447, 2007.

TAMAKI, T., et al. A weight-lifting exercise model for inducing hipertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 24, p. 881-886, 1992.

TAMAKI, T.; AKATSUKA, A.; TOKUNAGA, M.; ISHIGE, K.; UCHIYAMA, S.; SHIRAIISHI, T. Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats. . **American Journal Physiology**, v. 273, p.11, 1997

THORTON, K.; POTTEIGER, J. Effects of resistance exercise bouts of different intensities but equal work on EPOC. **Med Sci Sports Exerc.**, Statesboro, v. 34, 4, p. 715 – 22, abril, 2002.

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

TSUKUMO DM, CARVALHO-FILHO MA, CARVALHEIRA JB, PRADA PO, HIRABARA SM, SCHENKA AA. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n.8, p.1986-1988, 2007.

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

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

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

YASPELKIS BB, LESSARD SJ, REEDER DW, LIMON JJ, SAITO M, RIVAS DA, et al. Exercise reverses high-fat diet-induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 293, n.4, p. 941-949. 2007

YASPELKIS BB, KVASHA I, LESSARD S, RIVAS D, HAWLEY J. Aerobic training reverses high-fat diet-induced pro-inflammatory signaling in rat skeletal muscle. **Eur J App Physiol** v.110, n.4, p.779-88, 2010.

WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, FERRANTE AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**. 2003;112:1785-8.

WERNER C, FÜRSTER T, WIDMANN T, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. **Circulation**, n.120, p.2438-2447, 2009.

