

KAREN CRISTINA REGO GREGORIO



**O DESTREINAMENTO DE APENAS 4 SEMANAS PODE PIORAR
CONDIÇÕES TECIDUAIS E SÉRICAS EM RATOS ALIMENTADOS
COM DIETA HIPERCALÓRICA**

**Presidente Prudente
2018**

KAREN CRISTINA REGO GREGORIO

**O DESTREINAMENTO DE APENAS 4 SEMANAS PODE PIORAR
CONDIÇÕES TECIDUAIS E SÉRICAS EM RATOS ALIMENTADOS
COM DIETA HIPERCALÓRICA**

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. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente
2018

G821d

Gregorio, Karen Cristina Rego

O destreinamento de apenas 4 semanas pode piorar condições teciduais e séricas em ratos alimentados com dieta hipercalórica /

Karen Cristina Rego Gregorio. -- Presidente Prudente, 2018

66 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientadora: Patrícia Monteiro Seraphim

1. Obesidade. 2. Treinamento Resistido. 3. Destreinamento. 4.
Mitocôndrias. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O DESTREINAMENTO DE APENAS 4 SEMANAS PODE PIORAR CONDIÇÕES TECIDUAIS E SÉRICAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA

AUTORA: KAREN CRISTINA REGO GREGORIO
ORIENTADORA: PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM
COORIENTADOR: JAYME NETTO JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em FISIOTERAPIA, área: Avaliação e Intervenção em Fisioterapia pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM
Departamento de Fisioterapia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente



Prof. Dr. FABIO SANTOS DE LIRA
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP



Profa. Dra. GISELE ALBORGHETTI NAI
Lab. de Anatomia Patológica / Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente (Unoeste)

Presidente Prudente, 08 de outubro de 2018

A minha mãe e avó, que foram parte essencial na minha vida
para eu chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo o dom da vida, e por ser a base de tudo que realizo, pelos momentos bons que nos mostram como a vida vale a pena e pelos momentos ruins que me fizeram crescer e amadurecer.

A minha família por todo apoio e ajuda desde sempre, em especial a minha mãe, por nunca medir esforços para me ajudar e sempre me incentivar estudar e buscar sempre o melhor.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Patrícia, obrigada por ter me recebido em seu laboratório mesmo sem me conhecer, por ter tido paciência, pelos ensinamentos e por ser tornar minha mãe acadêmica. Tudo que aprendi durante o mestrado, foi você quem me ensinou e sou grata por isso, tenho orgulho de dizer que fui sua orientanda.

Ao Prof^o Dr Jayme Neto Junior cujo apoio inicial foi necessário, obrigada.

A minha melhor amiga e irmã de alma Carol, por estar sempre do meu lado em qualquer situação, por se alegrar pelas minhas conquistas como se fossem suas. Como sempre digo nossa amizade vem de outras vidas.

As minhas amigas de uma vida inteira Jéssica e Larissa, obrigada pelos incentivos, e por me ajudarem mesmo que indiretamente, vocês foram essências como sempre.

Aos membros do GPFIS que ajudaram direta ou indiretamente para realização desta dissertação, principalmente a Karol Rippi, pelos conselhos e desabafos diários, pelos momentos de distração e pela parceria, muito obrigada por ter se tornado minha amiga.

A prof^a Dr^a Gisele Alborghetti Nai, e os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica, da Universidade do Oeste Paulista- Unoeste obrigada pela parceria, foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos animais, obrigada por suas contribuições a ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém". Dalai Lama

SUMÁRIO

<i>APRESENTAÇÃO</i>	9
<i>RESUMO/ABSTRACT</i>	10
<i>INTRODUÇÃO</i>	12
<i>ARTIGO 1</i>	14
<i>ARTIGO 2</i>	38
<i>CONCLUSÃO</i>	63
<i>REFERÊNCIAS</i>	64
<i>ANEXO 1</i>	66

APRESENTAÇÃO:

Este modelo de dissertação é referente à pesquisa: “*O DESTREINAMENTO DE APENAS 4 SEMANAS PODE PIORAR CONDIÇÕES TECIDUAIS E SÉRICAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA*” realizada no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFIS) da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP – Presidente Prudente. De acordo com as regras do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, a presente dissertação está dividida nas seguintes sessões:

- Resumo/Abstract
- Introdução Geral

Artigo 1 – “*O DESTREINAMENTO FÍSICO CAUSA PERDA RÁPIDA DE BENEFÍCIOS METABÓLICOS GERADOS PELO TREINAMENTO RESISTIDO EM RATOS OBESOS*”

Artigo 2 – “*DESTREINAMENTO DE QUATRO SEMANAS MINIMIZA GANHOS FUNCIONAIS EM TECIDO CARDÍACO, HEPÁTICO E ARTÉRIA PULMONAR DE RATOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA*”

- Conclusão: conclusões gerais da pesquisa.
- Referências: Referentes ao texto de Introdução Geral.
- Anexo 1: Certificado da Comissão de ética no uso de animais (CEUA).

RESUMO

Introdução: Uma alimentação do tipo “*jung-food*” é cada vez mais frequente no dia-a-dia da população. Por possuir alto teor de sódio, açúcar e gorduras, conduz ao desenvolvimento de sobrepeso, obesidade, dislipidemias, hipertensão, disfunções mitocondriais e doenças hepáticas e cardiovasculares. O treinamento físico é uma ferramenta muito utilizada no combate de desenvolvimento de todas estas doenças, porém não está claro na literatura se poderia evitar o desenvolvimento de doenças na presença de ingestão de dieta hipercalórica e se a cessação do treinamento poderia afetar o efeito do treinamento físico nesta situação. **Métodos:** Foram utilizados 42 ratos machos Wistar divididos em: Controle Sedentário (CS), Obeso Sedentário (OS), Controle Exercício (CE), Obeso Exercício (OE), Controle Destreinado (CD), Obeso Destreinado (OD). Os grupos obesos foram alimentados com uma dieta hipercalórica. Os grupos exercitados realizaram treinamento resistido de 12 semanas, com cessação do treinamento na oitava semana para os destreinados. Foi feito o teste de tolerância a insulina (ITT) uma semana antes da eutanásia. Foram coletados sangue para análises de triglicerídeos e glicose, músculo sóleo para expressão de genes mitocondriais, e coração, pulmão e fígado para análise histológica no dia da eutanásia. Foram utilizados os testes Anova-One Way para comparação entre os grupos com pós-teste de Tukey, e teste de Kruskal Wallis para resultados não paramétricos (Esteatose). Valores de P inferiores a 5% foram considerados significativos. **Resultados:** Desde a quarta semana de intervenção OS apresentou maior peso corpóreo (PC) ($p < 0,01$). Já os grupos destreinados ganharam peso corpóreo de forma rápida após a oitava semana com a cessação do treinamento, tendo OD atingido PC semelhante ao do OS ($p < 0,0001$). OS também apresentou maior massa gorda ($p < 0,0001$). A glicemia de jejum do grupo CE foi menor quando comparado aos grupos CD e OD ($p = 0,0003$). Na análise do ITT, OS apresentou maior kITT ($p = 0,004$) comparado aos grupos CD e OD. Na análise de expressão de genes mitocondriais, o gene *Mnsod* ($p = 0,0117$) foi o único que sofreu regulação negativa com TR no grupo CE, comparado aos grupos CD e OD. Os grupos CE e OE apresentaram aumento na espessura ventricular esquerda em relação ao CS ($p = 0,0023$), porém em ventrículo direito foi observado aumento de espessura em OS em relação aos grupos CS e CE, e em OD comparado ao CE ($p = 0,0016$), acompanhada pela maior espessura de artéria pulmonar ($p < 0,0001$). Esteatose hepática foi encontrada nos grupos OS, OE e OD, com aumento na quantidade de macrófagos em OS em relação a todos os grupos ($p < 0,0001$). **Conclusão:** O modelo de dieta hipercalórica de 12 semanas promoveu instalação da obesidade comprovada pelo maior ganho de massa gorda, peso corpóreo e sensibilidade à insulina aumentada, caracterizando a fase de incorporação da massa gorda, efeitos esses minimizados com a implementação do treinamento resistido. Porém, com o destreinamento de 4 semanas, houve a reversão desses ganhos, capaz de aumentar a glicemia de jejum, reduzir sensibilidade à insulina, gerar hipertrofia patológica de ventrículo direito e esteatose, principalmente nos animais obesos destreinados, cujos resultados se equipararam aos animais obesos que nunca treinaram.

Palavras chave: Obesidade; Treinamento Resistido; Destreinamento

ABSTRACT

Introduction: A junk-food type food is increasingly common, and has a high sodium, sugar and fat content. The consumption of these foods leads to overweight and obesity, and consequently diseases such as dyslipidemia, hypertension, mitochondrial dysfunctions and liver and cardiovascular diseases.

Methods: Forty two male Wistar rats were divided in: Control Sedentary (CS), Obese Sedentary (OS), Control Exercised (CE), Obese Exercised (OE), Control Detrained (CD), Obese Detrained (OD). Obese groups were fed with hypercaloric diet. Trained groups performed resistance training during 12 weeks, with cessation of training in the eighth week. The insulin tolerance test (ITT) was done one week before euthanasia. Blood was collected for serum analysis, soleus muscle for expression of mitochondrial genes, heart, lung and liver for histological analysis on the day of euthanasia. Anova-One Way tests were used to compare the Tukey post-test and Kruskal Wallis test groups for non-parametric results (Steatosis). P values below 5% were considered significant. **Results:** Throughout the intervention period, the OS group gained the most weight. On the other hand, the detrained groups gained body weight rapidly after the eighth week with OD reaching final weight similar to OS ($p < 0.0001$), which presented the highest absolute fat mass ($p < 0.0001$). The fasting glycemia of the CE group was lower when compared to the detrained groups ($p = 0.0003$). In the ITT analysis, OS animals showed higher kITT ($p = 0.004$) when compared to the detrained groups. Mnsod gene expression ($p = 0.0117$) was reduced in CE compared to detrained groups. The CE and OE groups showed an increase in the left ventricular thickness compared to CS ($p = 0.0023$), while right ventricle thickness was in OS compared to CS and CE groups, and in OD group in relation to CE ($p = 0.0016$), which was accompanied by a greater pulmonary artery thickness ($p < 0.0001$). Steatosis was found in OS, OE and OD groups with an increase in the amount of macrophages in OS in relation to all groups ($p < 0.0001$). **Conclusion:** The 12-week hypercaloric diet model promoted obesity as a result of increased fat mass, body weight and increased insulin resistance, characterizing a fat mass concentration phase, the effects minimized with the implementation of resistance training. However, with the 4-week detraining, there was a reversion to gains, able to increase fasting glycemia, become responsible for insulin, generate pathological hypertrophy of right ventricle and steatosis, especially in the untrained obese, results were similar to obese animals who never trained.

Keywords: Obesity; Resistance Training; Detraining

INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo excesso de peso promovido pelo consumo calórico excessivo, associado a pouco gasto energético, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Em 2016, cerca de 1,9 milhões de adultos tinham sobrepeso e 650 milhões já eram obesos, com um aumento de 14% no número de crianças e adolescentes obesas entre 1975 a 2016⁽¹⁾, expondo esses indivíduos a maior chance de se tornarem adultos obesos, predispondo a instalação de quadro de síndrome metabólica (SM). A SM é um conjunto de doenças metabólicas tais como a obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares e hepáticas ⁽²⁾.

O aumento progressivo do sobrepeso populacional é resultado da transição no consumo alimentar, devido ao aumento na ingestão de carboidratos refinados, adição de adoçantes, óleos comestíveis e alimentos de origem animal⁽³⁾.

Esse consumo crônico de uma dieta rica em calorias, associado ao comportamento sedentário é apontado como a principal causa da obesidade, e já foi relacionado à disfunção cardíaca, fibrose, doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose, inflamação ⁽⁴⁻⁷⁾, estresse oxidativo e prejuízos na função mitocondrial ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Nesse contexto em que o comportamento sedentário associado a uma dieta hipercalórica é prejudicial à saúde, a atividade física entra como um meio de prevenção e tratamento contra obesidade e as doenças que ela acarreta⁽¹¹⁾. O treinamento resistido vem ganhando destaque por ser uma ferramenta útil no

controle do sobrepeso e suas consequências, podendo não somente manter a composição corporal como melhorar fatores mitocondriais, como biogênese, função e dinâmica mitocondrial^(12,13). Porém, com a cessação do treinamento, podem ou não ocorrer perdas nos ganhos adquiridos, com prejuízo na homeostasia corpórea^(14,15), como ganho de peso e regressão de hipertrofia fisiológica do ventrículo esquerdo⁽¹⁶⁾. Compreendemos que o exercício físico leva a adaptações fisiológicas, com o destreinamento de 4 semanas espera-se uma perda nessas adaptações, sejam elas completas ou parciais.

Maiores evidências do papel do destreinamento físico na função mitocondrial e suas consequências na composição corporal, cardiovascular e hepática em modelo de obesidade induzido por dieta são alvo de estudo relevante nos dias atuais, considerando que a dieta industrializada é um agravante da sociedade moderna.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do destreinamento físico de quatro semanas na expressão de proteínas relacionadas à biogênese, função e dinâmica mitocondrial, e sobre alguns parâmetros histomorfológicos cardiovasculares, hepáticos, pulmonares e bioquímicos em modelo animal obeso induzido por dieta hipercalórica.

ARTIGO 1



O DESTREINAMENTO FÍSICO CAUSA PERDA RÁPIDA DE BENEFÍCIOS METABÓLICOS GERADOS PELO TREINAMENTO RESISTIDO EM RATOS OBESOS

K.C.R. Gregorio¹, C.P. Laurindo¹, A.C.R. Moreno¹, P.M. Seraphim¹

1 - Departamento de Fisioterapia, Grupo de pesquisa em Fisiologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: A obesidade é um problema de saúde pública que afeta vários países, levando a consequências como doenças associadas as disfunções mitocondriais. **Métodos:** Foram utilizados 42 ratos machos Wistar divididos em: Controle Sedentário (CS), Obeso Sedentário (OS), Controle Exercício (CE), Obeso Exercício (OE), Controle Destreinado (CD), Obeso Destreinado (OD). Os grupos obesos foram alimentados com uma dieta hipercalórica. Os grupos exercitados realizaram treinamento resistido de 12 semanas, com cessação do treinamento na oitava semana para os destreinados. Foi feito o teste de tolerância a insulina (ITT) uma semana antes da eutanásia, coleta de sangue para análise de glicose e músculo sóleo para expressão de genes mitocondriais no dia da eutanásia. O teste de Anova-one way foi utilizado ($p < 0,05$) para comparação entre os resultados. **Resultados:** O grupo OS ganhou peso durante todo o período de intervenções. Já os grupos destreinados ganharam peso corpóreo de forma rápida depois da oitava semana com o OD atingindo peso final semelhante ao do OS ($p < 0,0001$), que apresentou maior massa gorda absoluta ($p < 0,0001$). A glicemia de jejum do grupo CE foi menor quando comparado aos grupos destreinados ($p = 0,0003$). Na análise do ITT, os animais OS apresentaram um maior kITT ($p = 0,004$) quando comparados com grupos destreinados. Na análise de genes mitocondriais da biogênese e da dinâmica da organela não foram encontrados resultados significantes entre os grupos, porém houve redução na expressão de *Mnsod* ($p = 0,0117$) no músculo sóleo do grupo CE em relação aos grupos destreinados. **Conclusão:** A dieta promoveu instalação da obesidade com maior ganho de massa gorda em animais que não treinaram ou que cessaram o treinamento. O destreinamento aumentou a glicemia de jejum, piorou sensibilidade à insulina, com aumento rápido de ganho de peso e aumentou expressão de marcador de estresse oxidativo, sugerindo que o destreinamento pode causar piora rápida no metabolismo corpóreo.

Palavras chave: Obesidade; Mitocôndrias; Treinamento Resistido; Destreinamento.

INTRODUÇÃO

A obesidade vem aumentando cada vez mais em todo o mundo. Isso ocorre principalmente devido à má alimentação, associado ao aumento no consumo de alimentos ultra processados (*junk-food*) com excesso de gorduras, sódio e açúcar⁽¹⁾.

Esse aumento excessivo no peso corpóreo leva ao aumento de doenças metabólicas como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemias, aterosclerose e disfunções mitocondriais⁽²⁾. Greene et. al descreveu a dieta ocidental como capaz de desregular a qualidade das mitocôndrias, atingindo de forma negativa a atividade de PGC1- α , o que evidencia a propensão de indivíduos obesos ou com sobrepeso às disfunções mitocondriais⁽³⁾.

A mitocôndria é uma organela com função essencial nas características adaptativas aos estímulos fisiológicos musculares⁽⁴⁾. Alguns estímulos como o exercício físico, desencadeiam a biogênese mitocondrial⁽⁵⁾. O PGC-1 α é uma proteína reguladora envolvida na formação de novas mitocôndrias e no controle da resposta celular ao estresse oxidativo⁽⁶⁾. Na biogênese, o PGC-1 α interage com fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), os quais são conhecidos por regular fatores de transcrição e replicação mitocondrial⁽⁷⁾ como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), cujo papel é regular a expressão do DNA mitocondrial (mtDNA) e outros genes, como citocromo c oxidase (Cycs). Portanto, a quantidade de TFAM é proporcional ao mtDNA, sendo um importante marcador de biogênese mitocondrial^(8,9). O óxido nítrico (NO) é um radical livre que pode ter participação na biogênese através da ativação do Monofosfato cíclico de guanosina e consequente ativação do PGC-1 α , exercendo função direta no metabolismo do músculo esquelético e mitocondrial através da sinalização do óxido nítrico sintase (NOS)⁽¹⁰⁾.

Na dinâmica mitocondrial estão inclusos os processos de fusão e fissão, cujos processos unem e separam mitocôndrias. Essa dinâmica é importante para manter a renovação de componentes e a remoção de mitocôndrias danificadas através da mitofagia⁽¹¹⁾.

Um dos meios para o tratamento e prevenção da obesidade é o treinamento resistido (TR)⁽¹²⁾. O TR age como um mecanismo anti-inflamatório no organismo, diminuindo o risco de complicações relacionadas à inflamação, como a resistência à insulina e obesidade⁽¹³⁻¹⁵⁾, além de estimular a biogênese mitocondrial em músculo esquelético^(16,17) através da ação de proteínas quinase como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Essas proteínas podem participar de processos na mudança do tipo de fibra muscular, além de estimularem fatores e cofatores transcricionais como o PGC1- α ⁽¹⁸⁾.

Em contrapartida, os efeitos positivos do TR estão sujeitos a decair com a cessação do exercício, perdendo bruscamente a função muscular adquirida⁽¹⁹⁾. Estudos em que ratos treinaram durante 8 semanas e cessaram o treinamento durante 4 semanas, houve indução ao transporte de glicose para produção de ácidos graxos em adipócitos na presença de insulina⁽²⁰⁾, ganho de peso corpóreo de forma rápida alcançando o peso de animais sedentários, e hipertrofia de adipócitos⁽²¹⁾. Todavia esses índices de perda foram pouco explorados no âmbito da biogênese e função mitocondrial em músculo esquelético após cessação do TR.

Sendo assim, o objetivo do estudo foi analisar o efeito do treinamento resistido de 12 semanas em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica e as consequências do destreinamento de 4 semanas em relação ao perfil bioquímico, grau de sensibilidade à insulina e expressão de genes mitocondriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, sob o protocolo 01/2017.

Caracterização da Amostra

Foram utilizados 42 ratos machos Wistar pesando aproximadamente 200g, provenientes do Biotério Central da Unesp – Botucatu. Os animais foram divididos de forma aleatória em 6 grupos: Controle sedentário (CS), Obeso sedentário (OS), Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD), com n=7. Os ratos permaneceram em gaiola plástica coletiva (30 x 16 x 19 cm) com 3 animais por gaiola no Biotério com temperatura ambiente controlada ($22\pm 2^{\circ}$ C), ciclos claro/escuro de 12/12 horas iniciado as 7:00h. Durante as duas semanas iniciais os animais passaram pelo período de adaptação ao ambiente, para posterior adaptação ao equipamento, teste de repetição máxima, e implementação da dieta hipercalórica e treinamento resistido de forma simultânea.

Dieta Hipercalórica (DH)

Durante 12 semanas, os animais dos grupos CS, CE e CD receberam água e ração padrão sem restrição. Os animais dos grupos OS, OE e OD receberam a dieta hipercalórica composta por ração padrão, refrigerante, água, mortadela, bolacha e chocolate branco, calculando 1200 Kcal por caixa, três vezes por semana, com análise semanal do peso corpóreo (PC) até o dia da eutanásia, conforme estudo previamente realizado⁽²²⁾.

Treinamento Resistido (TR)

O treinamento resistido foi realizado utilizando-se uma escada vertical em 80° de inclinação (1,1 x 0,18m) e 6 mm entre os degraus, com área de descanso 20 x 20 x 20cm no topo do equipamento para descanso do animal ao final de cada escalada (1 minuto)⁽²³⁾.

Antes do início do treinamento, para adaptar os animais ao equipamento foram realizadas duas sessões (intervaladas por 24h) de 4 repetições de escalada sem carga. Após a adaptação (24h) a carga máxima de treinamento foi determinada com base no Teste de Repetição Máxima (1RM). Com o auxílio de anilhas de chumbo para aplicação da carga, fixadas à extremidade da cauda do animal, iniciando-se com 50% do peso do animal com acréscimo de 30g a cada escalada realizada com sucesso, entre 4 e 9 séries para determinação, mantendo 2 minutos de descanso entre as escaladas. O teste era interrompido quando o animal não conseguia escalar voluntariamente após a estimulação caudal com discreto toque, determinando a carga anterior a interrupção do teste de 1RM.

Após 72 horas da determinação do teste de 1RM, o treinamento foi iniciado, 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), 4 séries de escalada durante 12 semanas, iniciando-se com 50% da 1RM, e progredindo para 75%, 85%, 95% e 100%⁽²⁴⁾.

Para a caracterização do destreinamento, os animais do grupo CD e OD cessaram o treinamento após a oitava semana de intervenção, permanecendo sem executar exercício físico intencional até a 12ª semana.

Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Para a avaliação da sensibilidade periférica à insulina “in vivo”, foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste consiste na administração de insulina regular, sendo avaliada a taxa de decaimento da glicose de 5 em 5 minutos ao longo de 25 minutos.

Os animais ficaram 6 horas em jejum de água e comida antes da realização do teste. O sangue coletado por punção caudal correspondendo ao tempo “zero” (basal) da coleta. Posteriormente administramos uma injeção intraperitoneal de insulina regular na dose de 1 UI / Kg de peso corpóreo, sendo coletado sangue por punção caudal nos tempos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos após injeção, utilizando glicosímetro (Biocheck, Brasil) para determinação da glicemia. Para realização das coletas das amostras de sangue, foi feita pequena secção na extremidade distal da cauda dos animais. O teste foi realizado uma semana antes da eutanásia.

Coleta do Material

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com os anestésicos Ketamina (60 mg/kg peso corporal) e Xilazina (10 mg/kg peso corporal), após 12 horas de jejum e 24 horas após a última sessão de treinamento. Após a ausência do reflexo de retirada da pata segundo o estímulo da dor, o músculo esquelético sóleo, tecido adiposo periepididimal e sangue foram coletados.

Os tecidos foram pesados para verificação de peso absoluto e relativo, no qual o peso absoluto é o peso em gramas do tecido total e para obtenção do peso relativo foram utilizados o peso corpóreo dos animais e o peso absoluto tecidual na seguinte fórmula: $\text{Peso Absoluto do tecido} \times 100 / \text{Peso Corpóreo Final}$.

A Linha temporal representa procedimentos realizados ao decorrer de 12 semanas (Figura 1).

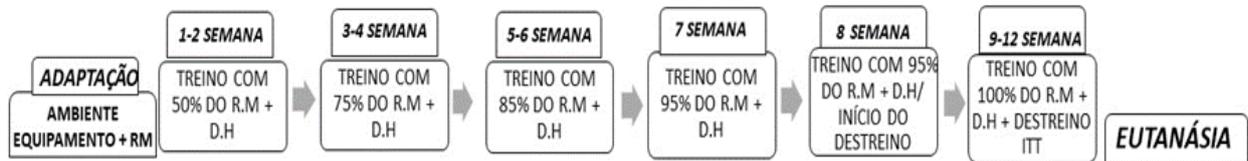


Figura 1. Linha temporal com as intervenções.

Avaliação sérica de glicose

Para as análises séricas, o soro foi separado por meio de centrifugação (centrífuga Eppendorf 5415R, Hamburgo - Alemanha) a 1.500 rpm durante 15 minutos a 4°C e posteriormente refrigerado. Para verificação de Glicose, Kits Comerciais (BIOCLIN, Minas Gerais - Brasil) foram utilizados, através de método enzimático com leitura de concentração em espectrofotômetro (CELM SB-190, Barueri - SP), em 505nm.

Análise da expressão de genes mitocondriais

A análise de expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à biogênese (PGC-1alfa, Nos3, MnSod, Cycs) e à função (Tfam, Nrf1), fissão (Fis1) e fusão (Mfn2) mitocondriais foi realizada em músculo esquelético oxidativo (m. sóleo) dos ratos, utilizando-se a técnica de RT-PCR em termociclador Techne (Cole Parmer, UK). O RNA total foi isolado das amostras de tecido com Brazol (LGCBio Brasil-SP), seguindo as instruções do fabricante. A fita de cDNA sintetizada utilizando-se 1µg de RNA total, primers randômicos e enzima ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, EUA), no ensaio de transcriptase reversa, seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes que posteriormente foi visualizado através do gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio em transluminador com luz UV (KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0,2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc. Nova Iorque - EUA), em seguida as imagens foram fotografadas e avaliadas pelo software gratuito Scion Image (Scion Corporation, Maryland - EUA.). Os primers para cada gene foram obtidos por encomenda em empresa especializada (Sigma-Aldrich. St. Louis, Missouri – EUA). As alterações na expressão gênica foram avaliadas e normalizadas usando um gene constitutivo *Gapdh* (Tabela 1).

Tabela 1. Genes e respectivos Primers utilizados.

GENE	SENSE 3'-5'	ANTI-SENSE 5'-3'	PB	NC	T°C	NCBI
<i>Pgc1-α</i>	TGACTGGCGTCATTCAGGAG	CAGGGCAGCACACTCTATGT	84	35	57°	NM_031347.1
<i>Tfam</i>	TGATCTCATCCGTCGCAGTG	TGCATTCAGTGGGCAGAAGT	205	37	55°	AJ312746.1
<i>Cyts</i>	CTTGGGCTAGAGAGCGGGA	CTCCCCAGGTGATACCTTTGT	259	39	55°	NM_012839.2
<i>Nrf1</i>	TACAAGGCGGGGACAGATA	ACTCCATCTGGGCCATTAGC	94	39	55°	NM_001100708.1
<i>Mfn2</i>	ATCTGGACCTGAATCGGCAC	AGAGCAGGGACATCTCGTTTC	123	38	56°	NM_130894.4
<i>Fis1</i>	TTTGAATACGCCTGGTGCCT	GCCTTTTCATATTCCTTGAGCCG	164	40	56°	NM_001105919.1
<i>Nos3</i>	TGACCCTCACCGATAACA	CGGGTGTCTAGATCCATGC	64	41	55°	NM_021838.2
<i>MnSod</i>	ACCGAGGAGAAGTACCACGA	CCTGAACCTTGACTCCCAC	285	33	55°	Y00497.1
<i>Gapdh</i>	CCTGGTATGACAATGAATATGG	AGGATACTGAGAGCAAGAGAGA	122	30	58°	NM_017008.4

PB= Pares de Base. NC= Número de Ciclos; T°C= Temperatura de Anelamento; NCBI=Sequência de referência.

Análise estatística

Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para a comparação entre grupos foi utilizado o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significantes, através do software Graphpad Prisma, versão 6.0.

RESULTADOS

O grupo OS obteve o maior peso corpóreo durante as 12 semanas de intervenção (Figura 2). Desde a 4ª semana OS já apresentava um aumento significativo de peso (30%) em relação ao grupo CD ($p=0,0106$), mantendo esse acréscimo no decorrer das semanas, chegando a ser significativo em relação a todos os grupos controles ($p=0,007$). Porém, com a cessação do treinamento, observou-se que os animais dos grupos destreinados adquiriram peso de forma mais rápida, com OD atingindo PC final próximo ao do encontrado em OS ($p<0,0001$).

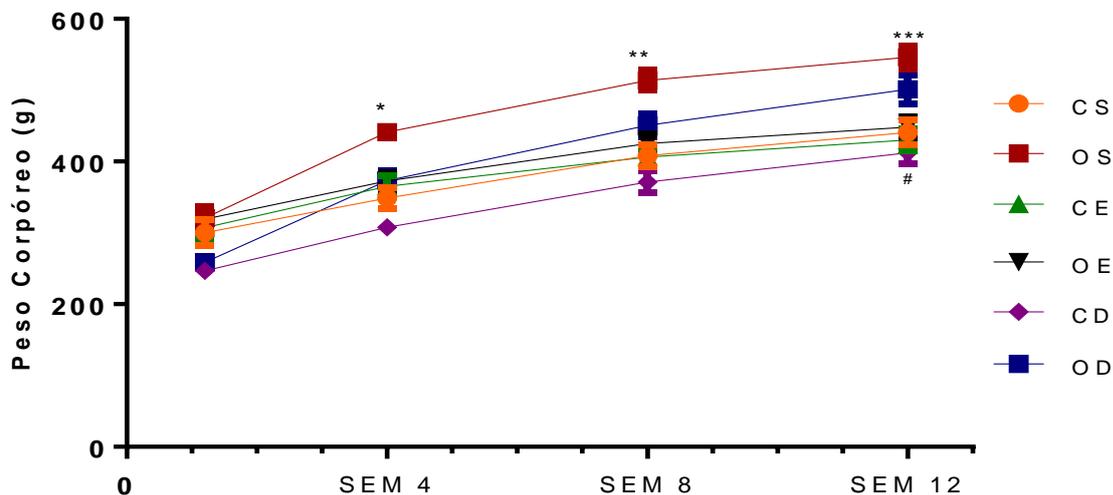


Figura 2. Evolução do ganho de peso ao longo de 12 semanas. Valores expressos em média dos grupos: Grupos (CS) Controle sedentário, (CO) Controle obeso, (CE) Controle exercitado, (OE) Obeso exercitado, (CD) Controle destreinado, (OD) Obeso destreinado. SEM 4: * $p=0,0106$ vs CD; SEM 8: ** $p=0,007$ vs CS, CE e CD; SEM 12: *** $p<0,0001$ vs CS, CE, OE, CD; # $p<0,0001$ vs OD.

Na análise do ITT, os animais OS apresentaram valor de KITT significativamente maior ($p=0,004$) do que os grupos destreinados CD e OD (Figura 3). Embora não significante, os grupos CD e OD apresentaram menor KITT do que os demais grupos CS, CE e OE. A glicemia de jejum apresentada pelo grupo OS atingiu valores mais

elevados do que o grupo CE em 38%, e em 27% do que o grupo OE ($p < 0,0001$). O grupo CE mostrou índices menores quando comparados com os animais destreinados CD e OD, em 32% e em 48%, respectivamente ($p = 0,0003$). O colesterol total não variou entre os grupos (resultado não apresentado).

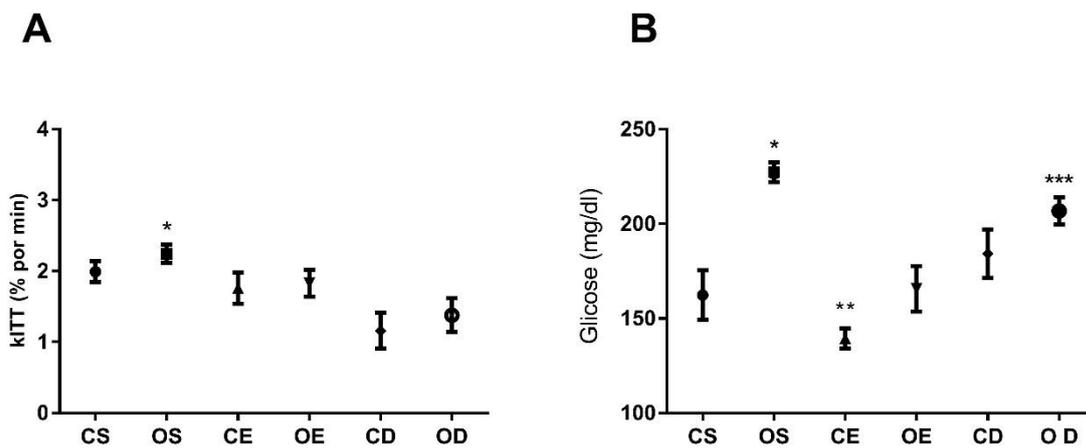


Figura 3. A: Constante de decaimento da glicose (kITT) expressa em percentual de decaimento por minuto, obtida no Teste de Tolerância a Insulina (ITT) * $p = 0,0045$ vs CD, OD; B: Valores médios referentes a glicemia em jejum * $p < 0,0001$ vs CS, CE, OE e CD; ** $p = 0,0003$ vs CD e OD; *** $p = 0,0216$ vs CS. Valores expressos em média \pm erro padrão da média dos grupos: (CS) Controle sedentário, (CO) Controle obeso, (CE) Controle exercitado, (OE) Obeso exercitado, (CD) Controle destreinado, (OD) Obeso destreinado. N=7 animais por grupo.

Os pesos absoluto e relativo do músculo Sóleo e do tecido adiposo são apresentados na Tabela 2. O grupo OS apresentou maior peso absoluto do músculo sóleo ($p = 0,0262$), porém esse resultado não foi encontrado no peso relativo muscular. Esse grupo também apresentou maior massa gorda absoluta comparado aos demais grupos, com aumentos de 67%, 55%, 36% e 77% comparados aos CS, CE, OE e CD, respectivamente ($p < 0,0001$). Nota-se que o peso absoluto e relativo de tecido adiposo dos grupos destreinados está semelhante ao encontrado nos grupos exercitados.

Tabela 2. Peso absoluto e relativo do Músculo Sóleo e Tecido Adiposo (T.A).

	Peso Absoluto M. Sóleo (g)	Peso Relativo M. Sóleo (g)	Peso absoluto TA (g)	Peso Relativo TA (g)
CS	0,286±0,020	0,067±0,004	5,500±0,421	1,285±0,085
OS	0,325±0,037*	0,060±0,007	15,06±1,330***	2,787±0,206***
CE	0,245±0,023	0,059±0,004	5,618±0,818	1,131±0,166
OE	0,209±0,013	0,047±0,002**	9,673±0,710#	2,049±0,122#
CD	0,250±0,021	0,065±0,004	3,414±0,168	0,876±0,044
OD	0,264±0,021	0,051±0,003	9,88±1,077#	1,920±0,168#

Valores expressos em média ± erro padrão da média dos grupos, (CS) Controle sedentário, (OS) Obeso Sedentário, (CE) Controle exercitado, (OE) Obeso exercitado, (CD) Controle destreinado, (OD) Obeso destreinado. *p= 0,0262 vs OE; **p= 0,0285 vs CS; *** p<0,0001 vs CS, CE, OE, CD, OD; # p<0,0001 vs CS, CE, CD. N= 7 animais por grupo.

Em relação aos genes de função mitocondrial (Figura 4), não foi encontrada diferença significativa na expressão de *Cycc*, já em *MnSod* houve redução significativa no grupo CE comparado com OD e CD (p=0,0117) no músculo esquelético sóleo e aumento de 20% no grupo OD quando comparado ao OS.

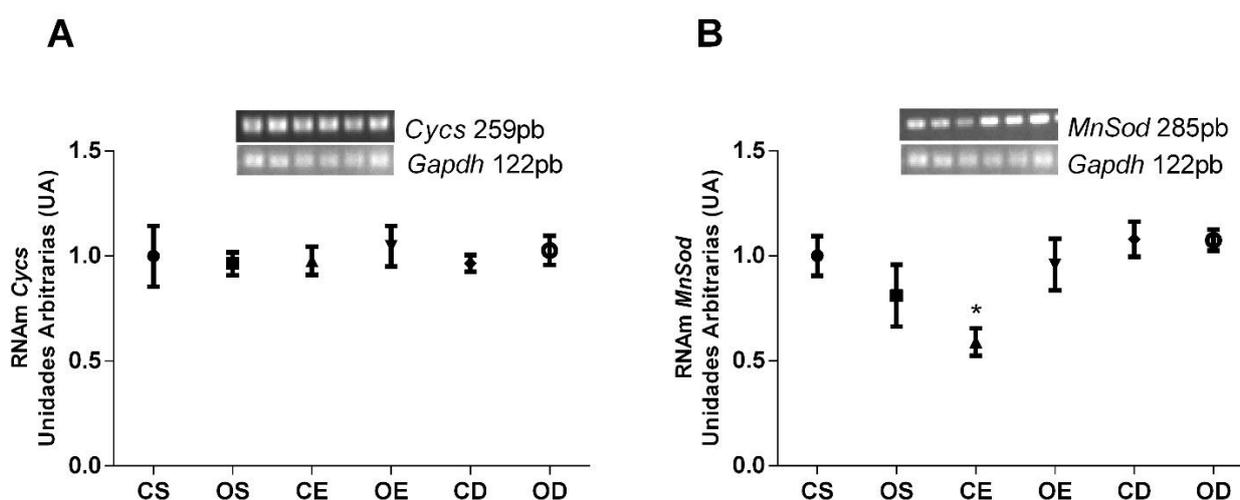


Figura 4 - Expressão de genes da Função mitocondrial no músculo esquelético sóleo. A: *Cycc* (Citocromo c); B: *Mnsod* (Superóxido dismutase) * p=0,0117 vs CD, OD. Valores expressos em média ± erro padrão da média N=7 animais por grupo.

Não foram obtidos resultados significativos na avaliação de expressão dos genes de fissão (*Fis1*) e fusão (*Mfn2*) (Figura 5), e dos genes da biogênese mitocondrial (*Nos3*, *Tfam*, *Nrf1* e *Pgc1α*) (Figura 6) no músculo sóleo.

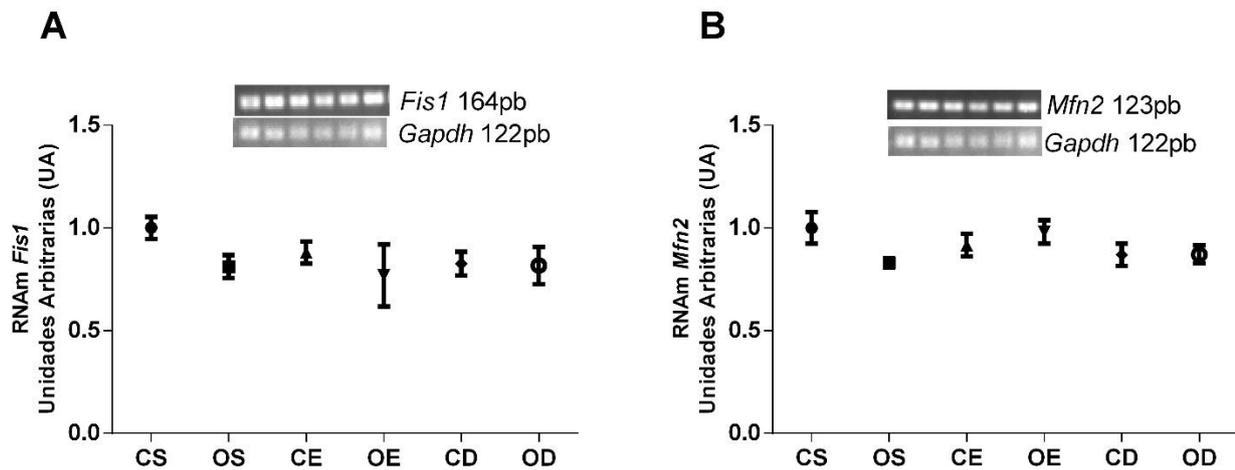


Figura 5 - Expressão de genes da Fusão e Fissão mitocondriais. A: *Mfn2* (Mitofusina 2); B: *Fis1* (Fissão 1). Valores expressos em média \pm erro padrão da média. N= 7 animais por grupo.

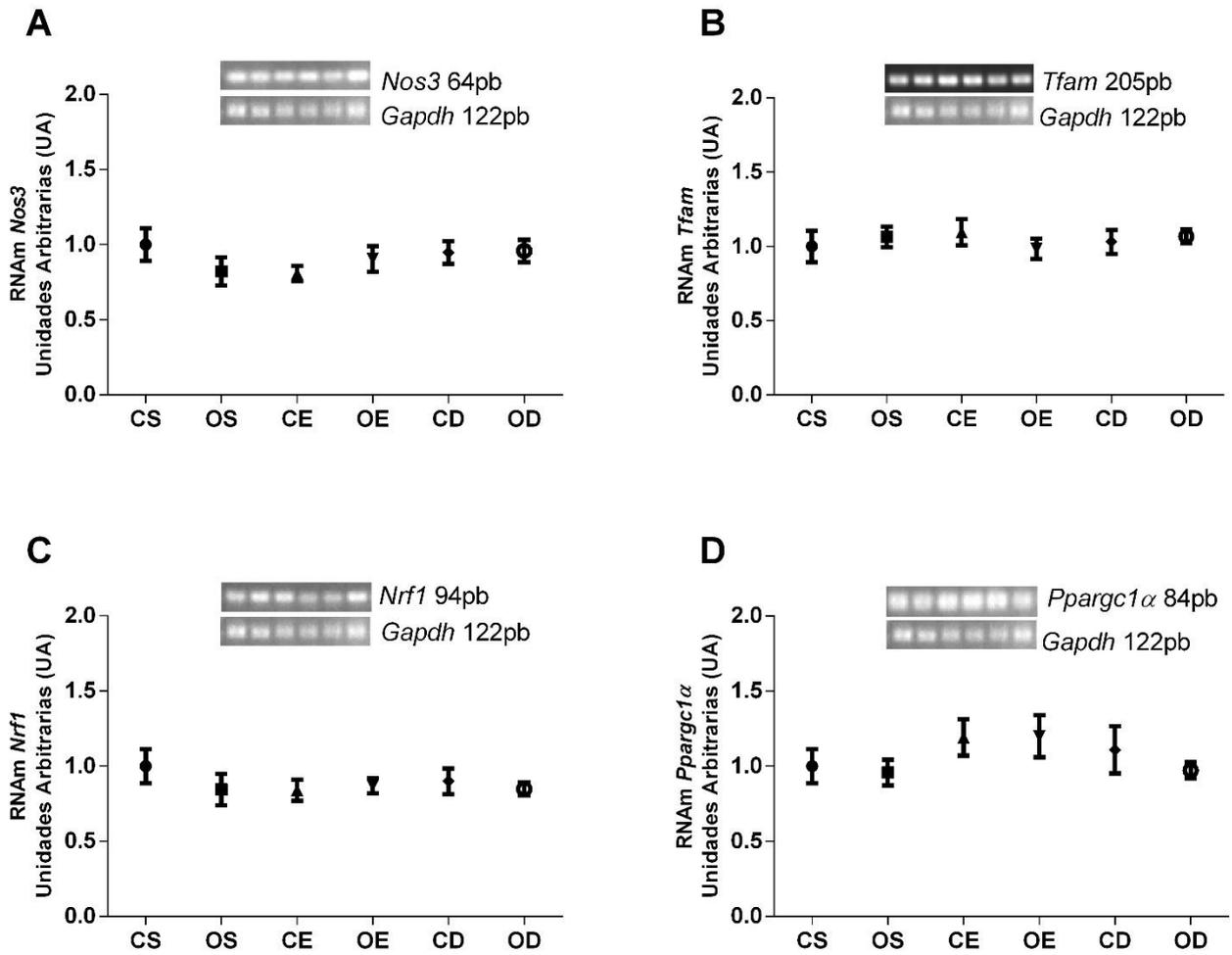


Figura 6 – Expressão de genes da Biogênese mitocondrial. A: *Nos3* (Oxido Nítrico Sintase Endotelial); B: *Tfam* (Fator de Transcrição mitocondrial A); C: *Nrf1* (Fator de Respiração Nuclear 1); D: *Pparg1α* (PGC1α). Valores expressos em média \pm erro padrão da média. N=7 animais por grupo.

DISCUSSÃO

Uma dieta rica em gordura e açúcares associado ao sedentarismo é prejudicial à saúde, e tem como consequência além da obesidade, doenças como resistência à insulina, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e hepáticas⁽²⁵⁾. Neste estudo, no decorrer das 12 semanas o grupo OS atingiu o maior ganho de peso, corroborando com estudos da literatura em que uma dieta rica em açúcares e gorduras ofertada cronicamente provoca aumento de peso em modelos murinos^(26,27). Em nosso estudo foi ofertado um modelo de dieta hipercalórica elaborado em nosso grupo de pesquisa, contendo 1200kcal, em alimentos variados para estimular a ingestão pelos animais, sendo eficiente em induzir obesidade.

O treinamento físico resistido imposto foi eficiente em manter o peso corpóreo dos animais nos grupos controles, já que o grupo CE apresentou o menor ganho de peso comparado com os grupos obesos. De forma semelhante, os animais OE atingiram valores muito próximos aos encontrados no grupo CE, sugerindo que mesmo com consumo de uma dieta hipercalórica, a prática de treinamento resistido evitou o ganho exagerado de peso corpóreo neste modelo^(28,29). Após a cessação do treinamento, nas últimas 4 semanas de intervenção, os grupos CD e OD adquiriram peso de forma mais rápida, no qual os animais do grupo OD chegaram a pesos que se aproximaram ao do grupo OS. Segundo Mazzucato et al (2012), o destreinamento físico de duas semanas já é capaz de gerar ganho de peso mais expressivo, podendo ser tão prejudicial quanto o sedentarismo. Em complemento, o peso do T.A do grupo OS foi o maior encontrado entre os grupos avaliados no estudo, evidenciando que o maior peso corpóreo apresentado se deve principalmente ao grande acúmulo de massa gorda ao longo das 12 semanas de imposição da dieta hipercalórica. Em contrapartida, o destreinamento físico parece ter causado ganho mais discreto na

massa gorda, mesmo na vigência de dieta hipercalórica. É provável que o ganho de peso desses animais destreinados, sem grande alteração na adiposidade como relatado⁽³⁰⁾ possa ter ocorrido semelhantemente ao estudo realizado em ratos destreinados por duas semanas, os quais também não apresentaram mudanças significativas de triglicérides circulantes, ressaltando que a prática regular de treinamento físico resistido é benéfica no controle de peso⁽³¹⁾.

Apesar da relação encontrada na literatura entre obesidade e resistência à insulina^(32,33), os resultados da constante de decaimento da glicose do teste de tolerância à insulina mostraram que o grupo OS apresenta valor maior de constante, sugerindo captação de glicose mais intensa e, portanto, indicando que esses animais poderiam estar mais sensíveis à ação hormonal. Isso realmente pode ocorrer no processo de desenvolvimento do tecido adiposo para completa instalação do quadro de obesidade. Acreditamos, que os animais do estudo estivessem nesta fase de desenvolvimento e, portanto, com sensibilidade à insulina aumentada após as 12 semanas de dieta hipercalórica. Outros modelos animais de obesidade evidenciaram este quadro de maior sensibilidade à insulina durante o processo de instalação da obesidade⁽³⁴⁾. Contudo, ao avaliarmos o valor de glicemia de jejum no dia da eutanásia, ao final das 12 semanas, foi detectado aumento nos grupos OS, CD e OD quando comparados aos demais grupos. Embora não tenhamos valores de insulinemia deste momento, somados os resultados, acreditamos que os animais OS, CD e OD podem estar começando a apresentar alterações na sensibilidade à insulina. Portanto, o aparente aumento da captação de glicose nos animais OS devido à aplicação de insulina exógena detectado no ITT pode ser correlacionada à etapa do grande desenvolvimento da massa gorda, com provável aumento do tamanho de adipócito⁽³⁵⁾, pois a insulina é o hormônio que promove aumento de 20% na captação

periférica de glicose em tecido adiposo e estimula a lipogênese nos adipócitos⁽³⁶⁾. Assim, apesar de apresentar aparente aumento da sensibilidade à insulina no teste ITT, este grupo apresenta valor elevado de glicemia de jejum, sugerindo possível início de resistência à insulina. Já nos animais destreinados a redução da massa gorda com provável redução de tamanho dos adipócitos, acabou exacerbando o efeito de menor sensibilidade à insulina.

Sabe-se que existe uma interligação entre a presença de obesidade e a disfunção mitocondrial⁽³⁷⁾. Autores já relataram prejuízos na dinâmica mitocondrial com a implementação de dieta hipercalórica em estudos com animais, demonstrando diminuição nos marcadores de fusão e/ou aumento nos de fissão em tecido muscular esquelético gastrocnêmio^(38,39). Por outro lado, o treinamento físico resistido pode manter o equilíbrio dos processos de dinâmica mitocondrial em condições normais e até mesmo minimizar os efeitos causados pela obesidade⁽¹¹⁾.

Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas entre a expressão de genes da biogênese e dinâmica mitocondrial no músculo esquelético oxidativo sóleo. Heo et al.⁽⁴⁰⁾ avaliou aspectos mitocondriais em ratos exercitados e expostos a dieta em diferentes músculos, e encontrou resultados significativos em músculo gastrocnêmio, mas não no músculo sóleo. Semelhantemente, em estudos anteriores também foram encontradas alterações mais expressivas em músculo gastrocnêmio. Por isso, acreditamos que o Treinamento Físico Resistido pode ser uma ferramenta que melhora a expressão de genes mitocondriais, mas em fibras musculares específicas glicolíticas oxidativas, porém em fibras musculares oxidativas presentes no músculo sóleo este efeito não seja expressivo, o que pode ser justificado pela periodização ou pelo tipo de exercício utilizado.

Contudo, na análise de expressão do gene da Mnsod, enzima importante do estresse oxidativo, encontramos uma menor expressão no grupo CE quando comparado aos grupos CD e OD, esse resultado corrobora com o descrito na literatura^(41,42) e evidencia que o treinamento físico pode ser benéfico para manter o equilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), mantendo o funcionamento normal das mitocôndrias. Uma disfunção na produção de EROS e antioxidantes como Mnsod, pode levar ao estresse oxidativo. EROS são produzidos como subproduto, na cadeia transportadora de elétrons (CTE) a partir do O₂ que é utilizado para a produção de ATP ao fim da CTE⁽⁴³⁾. Sendo assim, o aumento na expressão de Mnsod encontrado nos grupos destreinados pode indicar possível aumento do estresse oxidativo com uma maior produção de EROS e conseqüentemente uma maior estimulação da atividade de MnSOD. Esse resultado mostra que o destreinamento físico pode ser tão prejudicial quanto o sedentarismo na instalação de quadros de estresse oxidativo.

Em resumo, o treinamento físico resistido foi eficaz no controle de peso e da glicemia, sem envolver alterações na expressão de genes mitocondriais em músculo esquelético oxidativo. Por outro lado, a dieta hipercalórica imposta de 4 meses provocou a obesidade, com elevação da glicemia de jejum, porém sem alterar expressão de genes mitocondriais. O destreinamento gerou um ganho de peso mais rápido, menor sensibilidade à insulina periféricamente, e discreto aumento na expressão de marcador de estresse oxidativo, concluindo-se então que a cessação do treinamento resistido repentinamente pode levar a uma perda rápida dos benefícios adquiridos.

REFERÊNCIAS

1. Jaworowska A, Blackham TM, Long R, Taylor C, Ashton M, Stevenson L, et al. Nutritional composition of takeaway food in the UK. *Nutr Food Sci.* 2014;44(5):414–30.
2. Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *Int J Obes.* 2011;35(7):891–8.
3. Greene NP, Lee DE, Brown JL, Rosa ME, Brown LA, Perry RA, et al. Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1 α , is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. *Physiol Rep.* 2015;3(7).
4. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE, et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2009;61(14): 1369–74.
5. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009;47(4): 333–43.
6. Silveira LR, Pilegaard H, Kusuhara K, Curi R, Hellsten Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactivity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763(9):969–76.
7. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration

- of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2012;1819(9–10):1088–97.
8. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators. *Mol Cell Biol.* 2005;25(4):1354–66.
 9. Satoh JI, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway Analysis of ChIP-Seq-Based NRF1 Target Genes Suggests a Logical Hypothesis of their Involvement in the pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Gene Regul Syst Bio.* 2013;2013(7):139–52.
 10. Miller MW, Knaub LA, Olivera-Fragoso LF, Keller AC, Balasubramaniam V, Watson PA, et al. Nitric oxide regulates vascular adaptive mitochondrial dynamics. *AJP Hear Circ Physiol.* 2013;304(12):H1624–33.
 11. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exercise and Sport Sciences Reviews.* 2012;40(3):159–64.
 12. Fleck SJ, Kraemer WJ. *Fundamentos do Treinamento de Força Muscular.* Vol. 4, Porto Alegre: Artmed. 2017;40:472.
 13. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.,* 2006 Mar;17(1):4–12.
 14. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.*

2008;44(2):126–31.

15. Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited; 2008:109-502.
16. Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, et al. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*. 2003;52(8):1888–96.
17. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. Vol. 18, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2008;18: 426–34.
18. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011;110(1):264–74.
19. Hong SM, Hong AR, Shin YA. Effects of detraining on motor unit potential area, muscle function and physical performance based on CNTF gene polymorphism. *J Exerc Nutr Biochem*. 2014;18(2):151–60.
20. Sertie RAL, Andreotti S, Proenca ARG, Campana AB, Lima FB. Fat gain with physical detraining is correlated with increased glucose transport and oxidation in periepididymal white adipose tissue in rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2015;48(7):650–3.
21. Sertie RAL, Andreotti S, Proenca ARG, Campana AB, Lima-Salgado TM, Batista ML, et al. Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. *J Appl Physiol*. 2013;115(3):394–402.

22. Panveloski-Costa AC, Pinto Júnior DAC, Brandão BB, Moreira RJ, Machado UF, Seraphim PM. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(2):155–63.
23. Speretta G, Rosante M, Duarte F, Leite R, Lino A, Andre R, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics*. 2012;67(12):1469–77.
24. Leite RD, Durigan R de CM, De Souza Lino AD, De Souza Campos MV, Souza M das G, Selistre-De-Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism*. 2013;62(10):1477–84.
25. Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. Age-Related Consequences of Childhood Obesity. *Gerontology*. 2014;60(3):222–8.
26. Malafaia AB, Afonso P, Nassif N, Marcondes P, Ariede BL, Sue KN, et al. Obesity Induction With High Fat Sucrose in Rats. *Arq Bras Cir Dig*. 2013;26:17–21.
27. Uriarte G, Paternain L, Milagro FI, Martínez JA, Campion J. Shifting to a control diet after a high-fat, high-sucrose diet intake induces epigenetic changes in retroperitoneal adipocytes of Wistar rats. *J Physiol Biochem*. 2013 Sep 22;69(3):601–11.
28. Paes ST, Marins JCB, Andreazzi AE. Efeitos metabólicos do exercício físico na obesidade infantil: uma visão atual. Vol. 33, *Revista Paulista de Pediatria*. 2015;33:122–9.
29. Dias I, Montenegro R, Monteiro W. Exercícios físicos como estratégia de

- prevenção e tratamento da obesidade: aspectos fisiológicos e metodológicos. Rev Hosp Univ Pedro Ernesto. 2014;13(1):70–9.
30. Mazzucatto F, Higa TS, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. Int J Clin Exp Med. 2014;7(8):2000–8.
 31. You T, Arsenis NC, Disanzo BL, Lamonte MJ. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity: Current evidence and potential mechanisms. Sports Medicine. 2013;43: 243–56.
 32. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. Int J Mol Sci. 2014;15(4):6184–223.
 33. Roberts-Toler C, O'Neill BT, Cypess AM. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. Obesity. 2015 Sep;23(9):1765–70.
 34. Papa PC, Seraphim PM, Machado UF. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. Int J Obes. 1997;21(11):1065–70.
 35. Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol. 2001; 34(10):1353–62.
 36. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2002;46(4):419–25.
 37. Heo J-W, No M-H, Park D-H, Kang J-H, Seo DY, Han J, et al. Effects of exercise

- on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21(6):567–77.
38. Liu R, Jin P, LiqunYu L, Wang Y, Han L, Shi T, et al. Impaired Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics in Diabetic Skeletal Muscle. Strack S, editor. *PLoS One.* 2014 Mar;9(3):e92810.
 39. Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, Kuo L-H, Chang C-S, Su I-J, et al. Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Mol Cell Biol.* 2012;32(2):309–19.
 40. Heo J-W, No M-H, Cho H-S, Kim T-W, Yoon J-H, Park D-H, et al. Effects of obesity and exercise training on mitochondrial function and insulin resistance in aging skeletal muscle. *Korean Society of Exercise Rehabilitation.* 2017:101–101.
 41. Li G, Liu JY, Zhang HX, Li Q, Zhang SW. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol Res.* 2015;64(3):355–67.
 42. Konopka AR, Asante A, Lanza IR, Robinson MM, Johnson ML, Man CD, et al. Defects in mitochondrial efficiency and H₂O₂ emissions in obese women are restored to a lean phenotype with aerobic exercise training. *Diabetes.* 2015;64(6):2104–15.
 43. Bresciani G, da Cruz IBM, Gonzalez-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem.* 2015;68:87–130.

ARTIGO 2



DESTREINAMENTO DE QUATRO SEMANAS MINIMIZA GANHOS FUNCIONAIS EM TECIDO CARDÍACO, HEPÁTICO E ARTÉRIA PULMONAR DE RATOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA

K.C.R. Gregorio^A, C.P. Laurindo^A, A.C.R. Moreno^A, G.A Nai^B, P.M. Seraphim^A

A - Departamento de Fisioterapia, Grupo de pesquisa em Fisiologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. B- Departamento de Patologia, UNOESTE -Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: Uma das consequências da obesidade instalada é o surgimento de doença cardiovascular, com geração de aumento do volume sanguíneo e do trabalho cardíaco levando a uma remodelação cardiovascular. Além das complicações cardiovasculares, a obesidade também pode levar ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, gerando esteatose hepática. Por outro lado, o treinamento físico é uma ferramenta importante na prevenção contra a obesidade e demais doenças decorrentes de sua instalação. Entretanto, alguns dos benefícios promovidos pelo treinamento resistido podem se alterar, após períodos de inatividade física, ou destreino. **Objetivo:** Averiguar se o destreino de quatro semanas afeta possíveis benefícios que o treinamento físico pode gerar sobre perfil sérico e histomorfometria cardíaca, pulmonar e hepática em ratos alimentados por dieta hipercalórica. **Métodos:** Foram utilizados 42 ratos Wistar, divididos em 4 grupos: Controle Sedentário (CS), Controle Exercitado (CE), Controle Destreinado (CD), Obeso Sedentário (OS), Obeso Exercitado (OE) e Obeso Destreinado (OD). Para animais obesos foi ofertada uma dieta hipercalórica (D.H). O treinamento resistido (TR) foi realizado durante 12 semanas, com incremento de carga progressivamente, com cessação na oitava semana para os grupos destreinados. Foi coletado sangue para análise de triglicerídeos, o coração, o pulmão e o fígado foram coletados para análise anatomopatológica. Foram utilizados os testes de Anova-One Way para comparação entre os grupos e com pós-teste de Tukey e teste de Kruskal Wallis para resultados não paramétricos (Esteatose). Valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** O grupo OS comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$) e o grupo OD comparado aos grupos CS, CE e CD ($p < 0,0001$) apresentaram maior peso corpóreo ao fim do protocolo. Os grupos CE e OE apresentaram aumento na espessura ventricular esquerda em relação ao CS ($p = 0,0023$), porém em ventrículo direito foi observado aumento de espessura em OS em relação aos grupos CS e CE, e do grupo OD em relação ao CE ($p = 0,0016$). A espessura de artéria pulmonar também estava aumentada nos grupos destreinados comparados ao CS ($p < 0,0001$), e no grupo OS comparado ao CS, CE e OE ($p < 0,0001$). Os grupos OS, OE e OD apresentaram esteatose hepática e um aumento de triglicerídeos circulante e uma quantidade de macrófagos elevada em OS em relação a todos os grupos ($p < 0,0001$). **Conclusão:** A dieta hipercalórica provocou esteatose e maior infiltração de macrófagos no fígado. Por outro lado, o treinamento resistido realizado concomitante à ingestão de dieta hipercalórica minimizou estes dois efeitos provocados pela dieta. Adicionalmente, o treinamento resistido foi eficaz na prevenção de desenvolvimento de hipertensão pulmonar e de aumento exacerbado da massa adiposa e peso corpóreo mesmo na presença de dieta hipercalórica. O destreino de 4 semanas impediu o surgimento desses benefícios cardiopulmonares, independente da dieta associada.

Palavras chave: Obesidade; Treinamento Resistido; Destreino. Cardiovascular; Esteatose.

INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos extremamente calóricos ricos em gordura, sódio e açúcar estão presente em refeições tipo “*jung-food*”, e o avanço da tecnologia, induziu a população ao sedentarismo, levando a um desequilíbrio energético, baseado no alto consumo energético e baixo gasto calórico tendo como consequência o sobrepeso ou obesidade ^(1,2).

A obesidade é hoje um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, atingindo países desenvolvidos e em desenvolvimento, além de acarretar várias outras doenças, como diabetes tipo 2, dislipidemias, doenças cardíacas e hepáticas⁽³⁾. Todos esses fatos levam uma diminuição da qualidade de vida, seguida de diminuição na expectativa de vida^(4,5).

Tratando-se de doenças cardiovasculares (DC), mudanças na função e estrutura cardiovascular são algumas consequências da obesidade, que gera um aumento do volume sanguíneo e do trabalho cardíaco levando a uma remodelação cardiovascular^(6,7). O estudo de Martins Fernando et al (2015) mostrou que a dieta hipercalórica leva a uma remodelação cardíaca em ratos com aparecimento de hipertrofia e fibrose intersticial do miocárdio⁽⁸⁾.

Além das complicações cardiovasculares, a obesidade também pode levar ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, mais comumente chamada de esteatose hepática^(9,10), e pode evoluir para doença hepática gordurosa não alcoólica, podendo progredir para doenças mais graves como esteato-hepatite, cirrose e câncer⁽¹¹⁾.

Um tratamento simples e eficaz contra a obesidade e as doenças associadas é o Treinamento Físico Resistido⁽¹²⁻¹⁴⁾, capaz de promover mudanças no perfil lipídico, diminuição de massa gorda, e conseqüentemente, diminuição do peso corpóreo em indivíduos obesos^(15,16).

Entretanto, os benefícios conduzidos pelo treinamento resistido estão sujeitos a decair, após períodos de inatividade física, ou destreinamento, o que pode ser tão prejudicial quanto o sedentarismo. Estudos demonstram que os ganhos gerados pelo treinamento de resistência podem ser facilmente revertidos após algumas semanas de destreinamento, voltando ao estado pré-treinamento^(17,18). Bocalini et al (2010), demonstra que animais que realizaram natação durante oito semanas tiveram um remodelamento miocárdico com maior contração miocárdica, e após duas ou quatro semana de destreinamento essas adaptações foram perdidas⁽¹⁹⁾.

Portanto, o objetivo do estudo foi averiguar se o destreinamento de quatro semanas afeta possíveis benefícios cardiovasculares e hepáticos promovidos pelo treinamento resistido de oito semanas em ratos alimentados por dieta hipercalórica.

MÉTODOS

Todos os procedimentos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP campus de Presidente Prudente, sob o protocolo 01/2017.

Quarenta e dois ratos machos Wistar pesando 200 ± 50 g, provenientes do Biotério Central da Unesp – Botucatu, foram separados aleatoriamente em grupos com $n=7$: Controle sedentário (CS), Obeso sedentário (OS), Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD), com 3 animais por gaiola. O experimento ocorreu no Biotério II da FCT – Unesp – Presidente Prudente com temperatura de $22\pm 2^{\circ}$ C, ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Nas duas semanas iniciais os animais ficaram em período de adaptação ao ambiente, passado as duas semanas os animais foram submetidos à adaptação ao equipamento de escalada, teste de repetição máxima e início da dieta hipercalórica e do treinamento resistido.

Dieta Hipercalórica (DH)

Os animais receberam água e ração padrão à vontade durante 12 semanas. Os grupos que recebiam a dieta hipercalórica (OS, OE e OD) recebiam além da água e ração padrão, refrigerante, mortadela, bolacha e chocolate branco, com base num cálculo de 1200Kcal por caixa, 3x por semana. Foram avaliados peso corpóreo (PC) e ingestão calórica até o dia da eutanásia, conforme estudo já desenvolvido⁽²⁰⁾.

Treinamento Resistido (TR)

Foi realizado treinamento resistido utilizando-se escalada em escada vertical em 80° de inclinação (1,1 x 0,18m) com 6 mm entre cada degrau, com área de 20 x 20 x 20cm no topo do equipamento para descanso de 1 minuto ao final de cada escalada⁽²¹⁾.

Para adaptar os animais ao equipamento, foram realizadas duas sessões com um intervalo de 24 horas entre elas, em que os animais escalavam 4 vezes sem nenhum tipo de carga imposta. Vinte e quatro horas após a adaptação a carga máxima de treino foi determinada com base no Testes de uma Repetição Máxima (1RM). Anilhas de peso foram usadas para aplicação da carga, fixadas a extremidade caudal do animal, primeiro com 50% do peso do animal de carga, acrescentando 30g a cada escalada bem-sucedida, sendo 4 ou 9 séries para determinação, com um descanso de dois minutos entre cada escaladas. A interrupção do teste ocorria quando o animal não conseguia mais subir, mesmo com estimulação caudal, então a carga anterior a interrupção do teste era determinada como RM.

Determinado o RM de cada animal, iniciamos o treinamento depois de 72 horas. O treinamento ocorreu durante 12 semanas, sendo realizado 3 vezes por semana (segunda-quarta-sexta) com 4 séries de escalada, no início com 50% da RM, progredindo para 75%, 85%, 95% e 100%⁽²²⁾.

O destreinamento foi avaliado a partir da 8ª semana, quando os grupos CD e OD cessaram o treinamento resistido durante as 4 semanas restantes de experimento.

Coleta do Material

Para anestesiarem os animais foi utilizado os anestésicos Ketamina (60 mg/kg peso corporal) e Xilazina (10 mg/kg peso corporal) por via intraperitoneal. Os animais permaneceram em jejum de 12 horas, a última sessão de treinamento tinha ocorrido 24 horas antes. O tecido adiposo periepididimal, coração, pulmão e fígado foram coletados após a ausência do reflexo de retirada da pata segundo o estímulo da dor. A Linha do tempo representa procedimentos realizados ao decorrer de 12 semanas (Figura 1).



Figura 1 - Linha temporal com as intervenções.

Avaliação sérica de triglicerídeos

Para a análise sérica, o soro foi separado por meio de centrifugação (centrífuga Eppendorf 5415R, Hamburgo - Alemanha) a 1.500 rpm durante 15 minutos a 4°C e posteriormente refrigerado. Para verificação de triglicerídeos, Kits Comerciais (BIOCLIN, Minas Gerais - Brasil) foram utilizados, através de método enzimático com leitura de concentração em espectrofotômetro (CELM SB-190, Barueri - SP), em 505nm.

Análise anatomopatológica

Coração, pulmão e fígado foram coletados após a eutanásia. Após a retirada, o coração foi seccionado em corte coronal ao nível dos ventrículos e átrios, e metade foi submetida a processamento histológico. O fígado foi seccionado em cortes transversais.

Os cortes foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes de 5 μ foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil) e cortes de coração por tricrômio de Masson (Merck KgaA, Darmstadt Alemanha) para quantificação das fibras colágenas (análise fractal) e pelo método PAS-Azul de Alcian (Merck, Germany) para a avaliação da espessura das artérias pulmonares.

A confecção das lâminas foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), localizado no Campus I de Presidente Prudente, SP.

A análise anatomopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão).

No pulmão, a medida da espessura das artérias pulmonares foi realizada em duas áreas da artéria pulmonar, utilizando um sistema de análise de imagem Leica Application Application Suíte LAS 4.2.0 (Leica Microsystems, Suíça) em um aumento de 400x na coloração de PAS.

A espessura da parede do ventrículo foi determinada pela espessura da parede ventricular nos níveis papilares. Para medir a espessura da parede livre do ventrículo direito (VD), do septo interventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo (VE), foram realizadas duas medidas de cada imagem utilizando-se o sistema de análise de imagem Leica Application Suíte LAS 4.2.0 (Leica Microsystems, Suíça) em um aumento de 40x⁽²³⁾.

Dimensão fractal

Para a análise da dimensão fractal do VD e VE, as lâminas fotografadas passaram pelo processo de binarização e pelo método de box-counting, utilizando o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível online (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) gratuitamente.

O software ImageJ considera o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço. A análise fractal das lâminas histológicas é a relação entre a resolução e a escala avaliada, considerando como resultado: $DF = (\text{Log } N_r / \log r - 1)$, sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o software ImageJ ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

No fígado foi avaliada a presença e tipo de esteatose (0=ausente, 1= presente: microvesicular e/ou macrovesicular). Além da contagem das células de Küpffer em 10 campos de grande aumento (CGA), o que corresponde a cerca de 1mm², de cada amostra⁽²⁴⁾.

Análise estatística

Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média. Para a comparação entre grupos foi utilizado o teste ANOVA one-way , com pós-teste de Tukey e teste de Kruskall Wallis para resultados não paramétricos (Esteatose). Valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significantes através do software Graphpad Prisma, versão 6.0.

RESULTADOS

Na análise de peso corpóreo, os animais do grupo OS apresentaram maior peso ao fim do protocolo, com significância para os grupos CS, CE, OE e CD ($p<0,0001$). Porém, o grupo OD estava com peso 6% menor comparado ao grupo OS, mostrando significância em relação a CS, CE e CD ($p<0,0001$). Concomitante ao peso corpóreo mais elevado, observamos no consumo calórico que os animais OS e OD apresentaram maior ingestão ($p<0,0001$), e CE apresentou menor ingestão calórica comparado aos grupos CS, OE, CD e OD ($p<0,0001$) (Tabela 1).

Quando avaliados os pesos absoluto e relativo de tecido adiposo epididimal, foram encontrados maiores valores nos grupos dieta OS, OE e OD em relação aos grupos controle CS, CE e CD ($p<0,0001$), com ênfase para o grupo OS, que foi significativo ($p<0,0001$) em relação a todos os demais grupos.

Tabela 1. Parâmetros morfológicos dos animais ao final de 12 semanas.

	CS	OS	CE	OE	CD	OD
<i>Peso Corpóreo Final (g)</i>	426,0±14,1	537,7±15,7*	396,3±13,9	447,6±15,1	392,9±20,3	509,1±19,9**
<i>Ingestão Calórica (Kcal)</i>	732,4±13,1	1019±21,0*	586,5±56,1**	782,2±32,8	705,2±16,1	865,2±21,8#
<i>Peso Absoluto T.A (g)</i>	5,50±0,4	15,0±1,3*	5,61±0,8	9,67±0,7**	3,41±0,1	9,88±1,0**
<i>Peso Relativo T.A (g)</i>	1,28±0,0	2,78±0,2*	1,13±0,1	2,04±0,1**	0,87±0,0	1,92±0,1**

Valores expressos em média ± erro padrão da média dos grupos: Controle sedentário (CS), (CO) Controle obeso, Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD). Peso final dos animais: * $p<0,0001$ vs CS, CE, OE e CD ** $P<0,0001$ CS,CE e CD. Ingestão calórica semanal durante 12 semanas: * $p<0,0001$ vs CS, CE, OE, CD e OD; ** $p<0,0001$ vs CS, OE, CD e OD; # $p<0,0001$ CS e CD. Peso absoluto e Relativo de Tecido Adiposo: * $p<0,0001$ vs CS, CE, OE, CD, OD; ** $p<0,0001$ vs CS, CE, CD.

Na Figura 2, os grupos exercitados CE e OE apresentaram uma espessura 14% e 15% maior de ventrículo esquerdo com relação ao grupo CS ($p=0,0023$). Já no ventrículo direito, o grupo OS apresentou uma maior espessura comparado aos grupos CS e CE ($p= 0,0016$), ao mesmo tempo que OD apresentou aumento significativo em relação ao CE ($p= 0,0016$). Também podemos notar um aumento de 33% e 25% na espessura de septo interventricular nos animais OS em relação a OE e CD ($p=0,0004$), e uma maior espessura de artéria pulmonar em relação aos grupos CS, CE e OE ($p<0,0001$). Ao mesmo tempo que os grupos destreinados CD e OD também obtiveram uma maior espessura de artéria pulmonar, mas somente comparados ao grupo CS ($p<0,0001$).

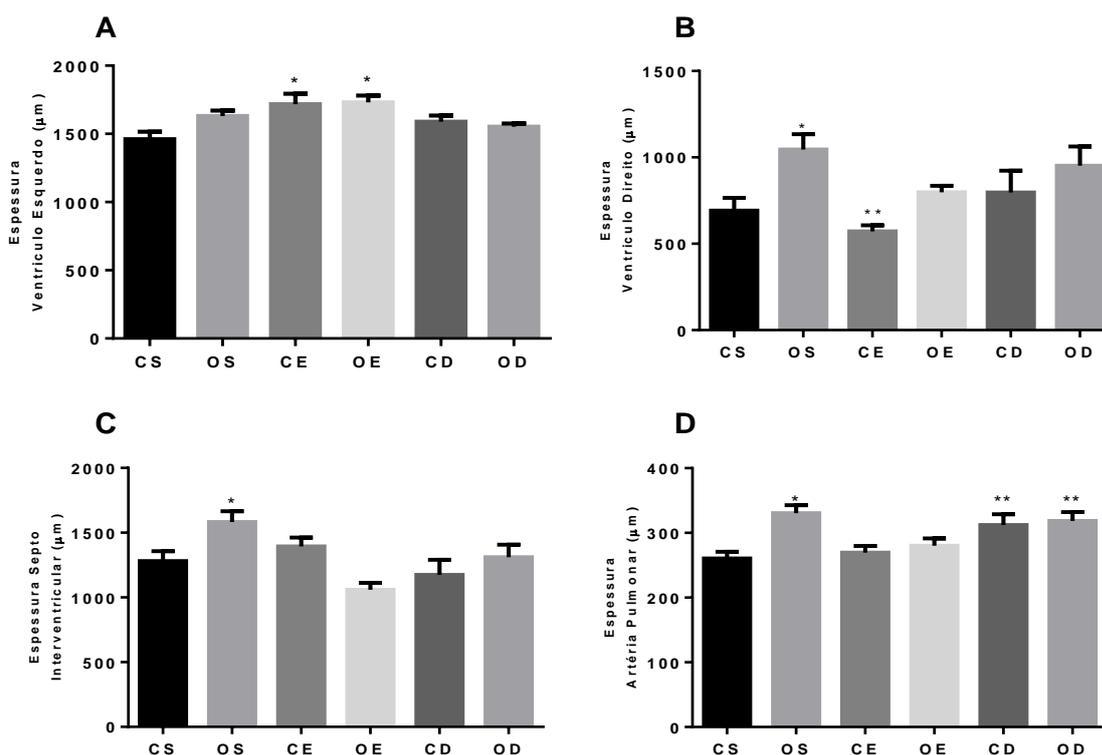


Figura 2 - A) Espessura do ventrículo esquerdo. * $p=0,0023$ vs CS. B) Espessura do ventrículo direito. * $p= 0,0016$ vs CS e CE; ** $p=0,0016$ vs OD. C- Espessura do septo intraventricular. * $p=0,0004$ vs OE e CD; D- Espessura da artéria pulmonar. * $p<0,0001$ vs CS, CE e OE; ** $p<0,0001$ vs CS. Valores expressos em média \pm erro padrão da média dos grupos: Controle sedentário (CS), (CO) Controle obeso, Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD).

Na Figura 3, na análise do ventrículo esquerdo, é possível observar que o grupo CD apresentou valores elevados de dimensão fractal em comparação aos grupos OS, CE e OE ($p=0,0018$). Já na avaliação do ventrículo direito, o grupo CE mostrou valores menores na dimensão fractal em relação aos grupos OS, CD e OD ($p<0,0001$).

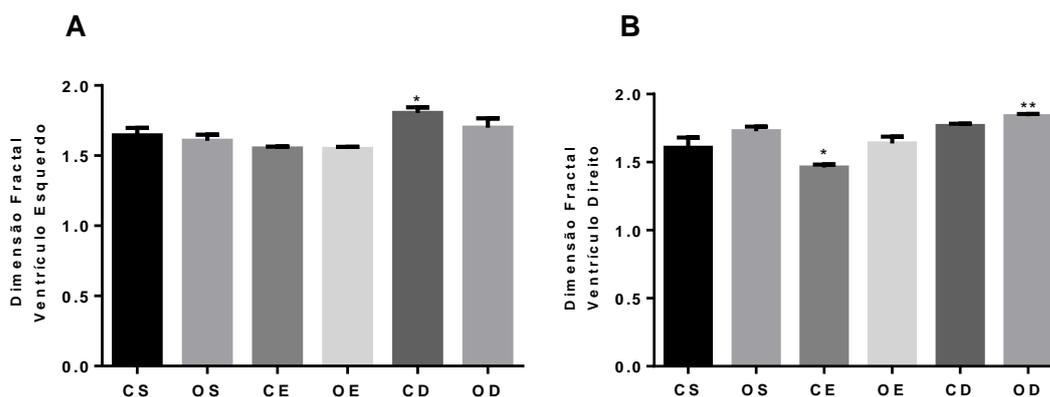


Figura 3 – A) Dimensão fractal do ventrículo esquerdo. * $p=0,0018$ vs OS, CE e OE. B) Dimensão fractal do ventrículo direito. * $p=0,0001$ vs OS, CD e OD ** $p=0,0001$ OE e CS. Valores expressos em média \pm erro padrão da média dos grupos: Controle sedentário (CS), (CO) Controle obeso, Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD).

Na análise da presença de células de Kupffer (macrófagos) nos hepatócitos da Figura 4, o grupo CS foi o que apresentou menor infiltração comparado com os demais grupos ($p<0,0001$). Já os animais OS apresentaram maior infiltração de macrófagos, alcançando um aumento cerca de 43%, 16%, 15%, 24% e 19% em relação a CS, CE, OE, CD e OD, respectivamente ($p<0,0001$).

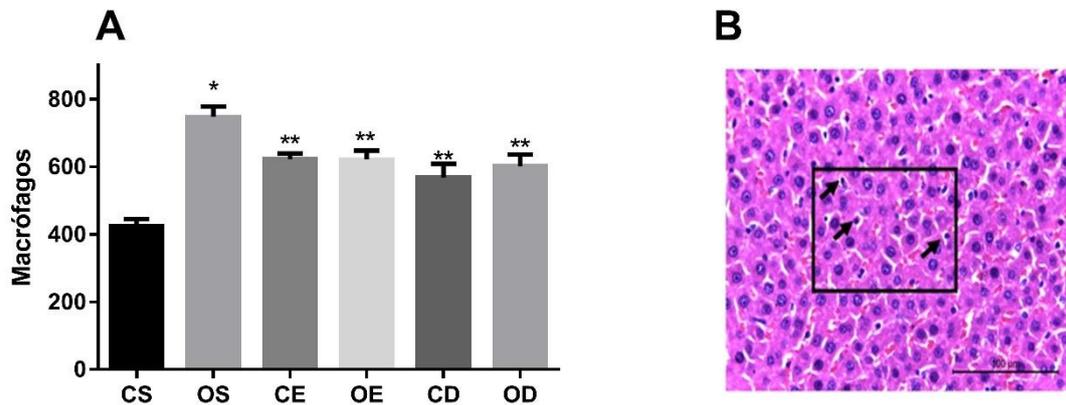


Figura 4 - A) Células de K upffer. * $p < 0,0001$ vs CS, CE, OE, CD e OD; $p < 0,0001$ vs CS. B) Imagem t pica de corte histológico corado com (HE), para contagem de células de Kupffer nos hepatócitos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média dos grupos: Controle sedentário (CS), (CO) Controle obeso, Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD). Imagem histológica de tecido hepático, as setas indicam os macrófagos.

Ainda na análise hepática foi encontrado esteatose (figura 5) nos grupos que receberam a dieta hipercalórica OS, OE e OD, com aumento significativo para os grupos OS e OD em rela o a CS, CE, CD ($P < 0,0001$). A esteatose observada nos grupos OS e OD eram de maneira difusa, abrangendo a maior parte do parênquima hepático. Poucos quadros focais foram encontrados nos animais OE, abrangendo 60% e 40% menos animais que OS e OD, mesmo que não significativos.

A figura 6 apresenta valores de análise sérica de triglicerídeos, podemos observar um aumento no grupo OS em rela o aos grupos CS, CE, OE e CD $p = 0,6072$. E mesmo não sendo significativos os outros grupos que receberam a dieta hipercalórica (OE e OD) têm também apresentaram valores elevados de triglicerídeos circulante.

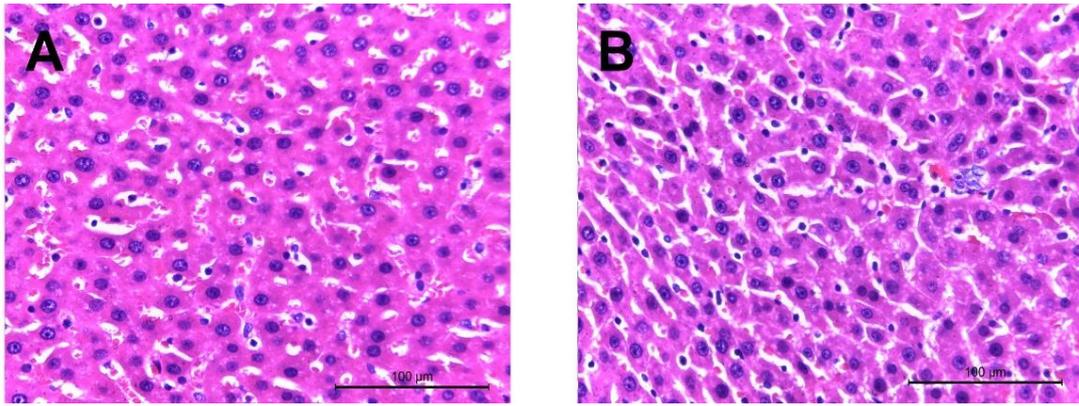


Figura 5 - A) Parênquima hepático sem alterações. B) Esteatose micro vesicular do tipo difusa.

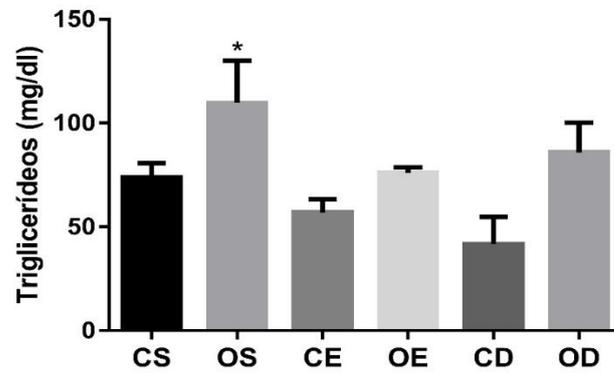


Figura 6. Valores de triglicérides (mg/dl). * $p=0,6072$ vs CS, CE, OE e CD. Valores expressos em média \pm erro padrão da média dos grupos: Controle sedentário (CS), (CO) Controle obeso, Controle exercitado (CE), Obeso exercitado (OE), Controle destreinado (CD), Obeso destreinado (OD).

DISCUSSÃO

A obesidade causa aumento de peso, e pode levar a várias outras doenças, e, conseqüentemente, a uma diminuição na qualidade e expectativa de vida⁽²⁵⁾. O protocolo de dieta utilizado nesse estudo foi eficiente para gerar obesidade nos animais que não treinaram concomitantemente à ingestão hipercalórica. Quando observamos que o peso corpóreo final dos animais OS foi semelhante ao encontrado em OD, sugere-se que o destreino físico associado à dieta hipercalórica leva ao maior ganho de peso, e que o protocolo de treinamento resistido foi eficiente para o controle de peso dos animais, já que o grupo OE mostrou peso corporal final semelhante ao encontrado no grupo CE. Esse aumento de peso é confirmado pelo fato da ingestão calórica estar aumentada também nos grupos OS e OD, o que vai ao encontro da literatura⁽²⁶⁾.

Além de mudanças no peso, a dieta hipercalórica pode levar à remodelação cardíaca e alterações hepáticas^(6,26). Em nosso estudo o aumento na espessura do ventrículo esquerdo foi maior nos grupos CE e OE, sugerindo uma hipertrofia fisiológica do ventrículo esquerdo provavelmente devido à prática de um treinamento físico resistido. Essa hipertrofia foi menor nos grupos destreinados sugerindo que as adaptações impostas pelo treinamento resistido no ventrículo esquerdo desapareceram com as 4 semanas de destreino^(27,28).

A obesidade também pode gerar danos na estrutura dos ventrículos, e função sistólica e diastólica, por conta da carga exercida levando a um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como descreveu Gonçalves et al (2016), cuja dieta hipercalórica durante 6 semanas em ratos levou à remodelação cárdica com hipertrofia, fibrose e disfunção diastólica⁽²⁹⁾.

Em nossos resultados, o grupo OS apresentou uma maior espessura de septo intraventricular em relação a todos os outros grupos, acompanhado de uma maior espessura de ventrículo direito (VD), sugerindo uma hipertrofia patológica do VD. Isso pode ser justificado pelo aumento na espessura da artéria pulmonar, sugerindo então que a artéria pulmonar desses animais estava hipertrofiada, e, provavelmente, fazendo com que o VD trabalhasse mais para manter o débito cardíaco, aumentando a pós-carga e levando a uma adaptação compensatória do VD o que, em longo prazo, poderia levar a uma insuficiência cardíaca e morte do animal^(30,31). Ao avaliarmos estes parâmetros nos animais OD, observamos que após a cessação do treinamento houve aumento de espessura de VD em comparação ao grupo CE, e que, mesmo não apresentando diferença significativa, há um visível aumento de espessura em CD. Em complemento, na análise da artéria pulmonar, os grupos destreinados apresentam maiores valores em relação ao CS. Assim, acreditamos que o destreinamento per se pode ter influenciado a sobrecarga imposta ao VD nos animais destreinados.

Na análise de dimensão fractal o aumento encontrado nos grupos OS, CD e OD vai ao encontro com os resultados de espessura ventricular direita e arterial. Ao mesmo tempo em que o treinamento resistido foi capaz de manter níveis mais baixos no grupo CE, mostrando o efeito da dieta hipercalórica associada ao sedentarismo e ou ao destreinamento. No que diz respeito às alterações morfológicas cardíacas induzidas por disfunções, já foi comprovado que a dimensão fractal é um método bastante eficiente⁽³²⁾. Esse aumento na dimensão fractal pode estar relacionado a um tecido mais denso e fibroso, já que nesse estudo foi utilizado para a análise de fibras colágeno⁽³³⁾.

Na avaliação hepática, foi possível notar que apenas os grupos que foram alimentados com uma dieta hipercalórica apresentaram esteatose, como já foi relatado na literatura⁽³⁴⁾. Entretanto, quando verificamos o tipo de esteatose concluímos que os animais OS e OD apresentavam esteatose difusa, enquanto OE continha poucos animais com esteatose focal, mostrando a eficiência do treinamento resistido em minimizar a instalação da esteatose. Sabe-se que a doença hepática gordurosa não alcoólica está associada à obesidade e às doenças metabólicas que ela acarreta devido ao acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos⁽³⁵⁾, incluindo o avanço da doença associado a quadros inflamatórios gerando fibrose tecidual, cirrose e até mesmo câncer⁽³⁶⁾. Os grupos que receberam dieta hipercalórica também apresentaram níveis mais elevados de triglicerídeos circulantes em relação aos demais grupos do estudo, sugerindo correlação com a esteatose hepática.

Em estudos da literatura encontramos diversas associações de quadro inflamatório relacionado à obesidade⁽³⁷⁾. Como apresentado, o grupo OS foi o único que se diferenciou estatisticamente dos demais, com um número exacerbado de macrófagos no parênquima hepático. Mesmo que não tenha sido avaliado processo inflamatório, acreditamos que isso se deva à esteatose encontrada nos animais, já que o acúmulo de tecido adiposo está diretamente associado com aumento de radicais livres, maior infiltração de macrófagos e aumento de citocinas pró inflamatórias, conduzindo a um quadro de inflamação tecidual⁽³⁸⁾, que poderá evoluir para um quadro de esteatohepatite.

Conclui-se que apesar do treinamento resistido ser benéfico no controle de peso, hipertrofia cardíaca fisiológica, aumento compensatório de espessura ventricular e menor infiltração de macrófagos no fígado, o destreinamento de 4

semanas parece ter piorado o quadro de hipertensão pulmonar e hipertrofia cardíaca, independente da associação à dieta hipercalórica.

REFERÊNCIAS

1. Pi-Sunyer FX. The Obesity Epidemic: Pathophysiology and Consequences of Obesity. *Obes Res.* 2002;10(S12):97S–104S.
2. Farhat T, Iannotti RJ, Simons-Morton BG. Overweight, Obesity, Youth, and Health-Risk Behaviors. *Am J Prev Med.* 2010;38(3):258–67.
3. FAO, OPAS O. América Latina e o Caribe - Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional: Sistemas alimentares sustentáveis para acabar com a fome e a má nutrição. 2016. p. 42.
4. Ludwig DS. Epidemic Childhood Obesity: Not Yet the End of the Beginning. *Pediatrics.* 2018;141(3):e20174078.
5. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014;37:S81–90.
6. Lavie CJ, De Schutter A, Parto P, Jahangir E, Kokkinos P, Ortega FB, et al. Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis-The Obesity Paradox Updated. *Progress in Cardiovascular Diseases.* W.B. Saunders; 2016;58:537–47.
7. Lavie CJ, McAuley PA, Church TS, Milani R V., Blair SN. Obesity and cardiovascular diseases: Implications regarding fitness, fatness, and severity in the obesity paradox. *Journal of the American College of Cardiology.* Elsevier; 2014;63:1345–54.
8. Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, et al. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model

- of Obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(5):479–86.
9. Pinto CG de S, Marega M, Carvalho JAM de, Carmona FG, Lopes CEF, Ceschini FL, et al. Physical activity as a protective factor for development of non-alcoholic fatty liver in men. *Einstein (São Paulo).* 2015;13(1):34–40.
 10. Chang E, Park CY, Park SW. Role of thiazolidinediones, insulin sensitizers, in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Diabetes Investigation.* Wiley-Blackwell; 2013;4:517–24.
 11. Nascimento JHR do, Epifanio M, Soder RB, Baldisserotto M. MRI-diagnosed nonalcoholic fatty liver disease is correlated to insulin resistance in adolescents. *Acad Radiol.* 2013;20(11):1436–42.
 12. Shamsoddini A, Sobhani V, Ghamar Chehreh ME, Alavian SM, Zaree A. Effect of Aerobic and Resistance Exercise Training on Liver Enzymes and Hepatic Fat in Iranian Men With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepat Mon.* 2015;15(10):e31434.
 13. Lloyd RS, Faigenbaum AD, Stone MH, Oliver JL, Jeffreys I, Moody JA, et al. Position statement on youth resistance training: The 2014 International Consensus. *Br J Sports Med.* 2014;48(7):498–505.
 14. Paes ST, Marins JCB, Andreazzi AE. Efeitos metabólicos do exercício físico na obesidade infantil: uma visão atual. *Revista Paulista de Pediatria.* No longer published by Elsevier; 2015;33:122–9.
 15. Schurt A, Liberali R, Navarro F. Exercício contra resistência e sua eficácia no tratamento da obesidade: uma revisão sistemática. *Rev Bras Obesidade, Nutr e emagrecimento.* 2016;10(59):215–23.

16. De DS, Pereira RP. Perfil dos fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis em escolares da zona urbana e rural. *Rev Bras Prescrição e Fisiol do Exerc.* 2018;12(72):38–45.
17. Abad C, Cuniyochi R, Kobal R, Gil S, Pascoto K, Nakamura F, et al. Efeito do destreinamento na composição corporal e nas capacidades de salto vertical e velocidade de jovens jogadores da elite do futebol brasileiro. *Rev Andaluza Med del Deport.* 2016;9(3):124–30.
18. Bae JY, Woo J, Roh HT, Lee YH, Ko K, Kang S, et al. The effects of detraining and training on adipose tissue lipid droplet in obese mice after chronic high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):13.
19. Bocalini DS, Carvalho EVA, De Sousa AFM, Levy RF, Tucci PJF. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010;109(5):909–14.
20. Panveloski-Costa AC, Pinto Júnior DAC, Brandão BB, Moreira RJ, Machado UF, Seraphim PM. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(2):155–63.
21. Speretta G, Rosante M, Duarte F, Leite R, Lino A, Andre R, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics.* 2012;67(12):1469–77.
22. Leite RD, Durigan R de CM, De Souza Lino AD, De Souza Campos MV, Souza M das G, Selistre-De-Araújo HS, et al. Resistance training may

- concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism*. 2013;62(10):1477–84.
23. Gay-Jordi G, Guash E, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont L, et al. Losartan Prevents Heart Fibrosis Induced by Long-Term Intensive Exercise in an Animal Model. de Windt LJ, editor. *PLoS One*. 2013;8(2):e55427.
 24. Mori GG, De Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR, Capaldi MLPM. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. *Dent Traumatol*. 2009;25(2):209–12.
 25. Aballay LR, Eynard AR, Díaz M del P, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev*. 2013;71(3):168–79.
 26. Lozano I, Van Der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: Impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab*. 2016;13(1):15.
 27. Kovacs R, Baggish AL. Cardiovascular adaptation in athletes. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26(1):46–52.
 28. Sharma S, Merghani A, Mont L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J*. 2015;36(23):1445–53.
 29. Gonçalves N, Silva AF, Rodrigues PG, Correia E, Moura C, Eloy C, et al.

- Early cardiac changes induced by a hypercaloric Western-type diet in “subclinical” obesity. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2016;310(6):H655–66.
30. Guarracino F, Cariello C, Danella A, Doroni L, Lapolla F, Vullo C, et al. Right ventricular failure: physiology and assessment. *Minerva Anestesiol*. 2005;71(6):307–12.
 31. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115(1):176–88.
 32. Pacagnelli FL, Sabela AKD de A, Mariano TB, Ozaki GAT, Castoldi RC, Carmo EM do, et al. Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(1):33–9.
 33. Zouein FA, Kurdi M, Booz GW, Fuseler JW. Applying Fractal Dimension and Image Analysis to Quantify Fibrotic Collagen Deposition and Organization in the Normal and Hypertensive Heart. *Microsc Microanal*. 2014;20(04):1134–44.
 34. Marciano R de C, Urias GMPC, Carvalho C de. ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA. *Rev Ciência e Saúde On-line*. 2017;2(3).
 35. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6184–223.

36. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* . 2017;37:81–4.
37. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V. Obesity and Inflammation. In: *Compendium of Inflammatory Diseases*. Basel: Springer Basel; 2016: 1017–29.
38. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. López Lluch G, editor. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154003.

CONCLUSÃO

O treinamento resistido em escada foi eficiente em reduzir ganho de peso corpóreo e melhorar perfil bioquímico de ratos alimentados com dieta hipercalórica, gerou hipertrofia fisiológica cardíaca, mas não foi capaz de evitar o aparecimento de quadro de esteatose promovido pela dieta.

O destreinamento de 4 semanas foi capaz de reverter todos os benefícios alcançados através do treinamento resistido em tecido cardíaco e arterial pulmonar, no perfil bioquímico, e acelerou ganho de peso corpóreo.

Portanto, acreditamos que, considerando a velocidade de desenvolvimento de um quadro prejudicial à saúde, destreinar tem um efeito mais negativo do que ser sedentário sobre perfil bioquímico, funcionalidade de tecido cardíaco e artéria pulmonar.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and Overweight. 2017.
2. Farhat T, Iannotti RJ, Simons-Morton BG. Overweight, Obesity, Youth, and Health-Risk Behaviors. *Am J Prev Med.* 2010;38(3):258–67.
3. Bezerra IN, Moreira TMV, Cavalcante JB, Souza A de M, Sichieri R. Food consumed outside the home in Brazil according to places of purchase. *Rev Saude Publica.* 2017;51:15.
4. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 2011;34: 274–85.
5. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circulation Research. NIH Public Access;* 2016;118(11):1786–807.
6. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56(4):369–81.
7. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology. NIH Public Access;* 2014;63(4):250–9.
8. Bostick B, Habibi J, Ma L, Aroor A, Rehmer N, Hayden MR, et al. Dipeptidyl peptidase inhibition prevents diastolic dysfunction and reduces myocardial fibrosis in a mouse model of Western diet induced obesity. *Metabolism.* 2014;63(8):1000–11.

9. Popkin BM. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. *Current Diabetes Reports*. 2015;15(9):64.
10. Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics. *Front Physiol*. 2015;6:3135–45.
11. Alves C, de Souza S, de Azevedo N, Barbosa D, Venturini D, Okino AM. Performance on functional capacity tests and level of physical activity in women with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:A233.
12. Ciolac EG, Rodrigues-da-Silva JM. Resistance Training as a Tool for Preventing and Treating Musculoskeletal Disorders. *Sports Medicine*. 2016;46(9):1239–48.
13. Porter C, Reidy PT, Bhattarai N, Sidossis LS, Rasmussen BB. Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2015;47(9):1922–31.
14. Seraphim P, Freitas M, Teixeira M, Teixeira G, Nunes MT, Filho JCC. Resistance training reduces skeletal muscle inflammation even after 4-week detraining in obese rats. *Endocr Abstr*. 2017;
15. Oláh A, Kellermayer D, Mátyás C, Németh BT, Lux Á, Szabó L, et al. Complete Reversion of Cardiac Functional Adaptation Induced by Exercise Training. *Med Sci Sports Exerc*. 2017;49(3):420–9.
16. Yasari S, Paquette A, Charbonneau A, Gauthier M-S, Savard R, Lavoie J-M. 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 = Physiol Appl Nutr métabolisme*. 2006;31(4):367–75.

ANEXO 1

Certificado da Comissão de ética no uso de animais (CEUA)



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da Cessação de Treinamento Resistido sobre a Expressão de Proteínas do Metabolismo Mitocondrial em Tecido Adiposo e Músculo Esquelético de Ratos Obesos**", protocolo nº **01/2017** sob responsabilidade de **Patrícia Monteiro Seraphim** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUAS da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, em reunião de **30/06/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2017 a Janeiro de 2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	48
Peso/Idade	200g/ 45 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. Raul Antonio Fragoso Neto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Roberto Simonsen, 305 - CEP 19060-900 - Presidente Prudente - SP
Tel (18) 3229-5315 - fax (018) 3229-5488 ou (018) 3229-5303 - ceua@fct.unesp.br