

KIM SAMPAIO DE LACERDA MILESKI

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO NA
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TERMOGÊNESE DO TECIDO
ADIPOSO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA**

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

KIM SAMPAIO DE LACERDA MILESKI

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO NA
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TERMOGÊNESE DO TECIDO
ADIPOSO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientadora: Adriana Lofrano Alves Porto

Co-Orientador: Luiz Guilherme Grossi Porto

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

2018

KIM SAMPAIO DE LACERDA MILESKI

EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TERMOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 8 de JUNHO de 2018.

BANCA EXAMINADORA

**Adriana Lofrano Alves Porto
Universidade de Brasília**

**Gabriela Resende
Centro Universitário de Brasília**

**Guilherme Eckhardt Molina
Universidade de Brasília**

**Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília**

*Dedico este trabalho a minha família, que me apoiou em todos os momentos.
Graças a vocês eu pude seguir os meus sonhos e consegui ver cada um deles se
tornar realidade.*

AGRADECIMENTOS

Obrigado, primeiramente a **Deus**, por me guiar. Venho aprendendo cada vez mais que a fé torna as coisas possíveis, mas não fáceis. Deus sabe o que é melhor para mim e conhece profundamente as minhas necessidades. Há muitos anos não peço nada porque já tenho e sou muito mais do que eu imaginei um dia. Você é a minha verdadeira força.

Não poderia deixar de agradecer todo o investimento que recebi da **Universidade de Brasília** na minha formação pessoal e profissional. Por vários anos pude pesquisar, estudar e aprender, com todo o apoio estrutural e financeiro que eu precisava. Sempre digo que a Universidade de Brasília é minha segunda casa.

Muito obrigado **Adriana Lofrano Alves Porto** e **Luiz Guilherme Grossi Porto**, queridos orientadores, pelas frases de apoio, pelos ensinamentos e pela tão sonhada oportunidade de ter uma carreira acadêmica. Serei sempre grato pelo reconhecimento e pela aposta no meu trabalho. Obrigado também pelos ensinamentos éticos e pelo perfeccionismo em busca de uma pesquisa com maior qualidade possível.

Muito obrigado **Michela Soares Coelho**, minha co-orientadora, por me ensinar sobre pesquisa e tratamento dos animais de laboratório e por tornar este trabalho possível de diversas maneiras. Agradeço por ser um exemplo de organização em pessoa, que me fez mudar como pesquisador e aumentar a eficiência das minhas leituras.

A todos os **colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular – FARMOL**, em especial a **Sidney Alcântara Pereira**, **Cynthia Gabriel Meireles** e **Fernanda Cerqueira Barroso Oliveira** pela grande paciência que tiveram comigo e por todas as nossas conversas e experimentos realizados no laboratório. Pelo apoio técnico e emocional nos momentos difíceis e por compartilhar um tempo juntos, me

fazendo perceber outras maneiras de encarar meus desafios. Vocês também foram, na verdade, meus orientadores.

Aos **colegas do grupo de estudos em aptidão física e saúde – GEAFS**, pelos momentos de crescimento proporcionado por nossos encontros e reuniões, pelas dicas diretas sobre as minhas apresentações. Vocês sempre se preocupam em ajudar uns aos outros e fazer a nossa área se tornar cada vez mais forte, mas sem esquecer do objetivo final, que é ajudar as pessoas a ter uma vida melhor.

Aos **veterinários** do laboratório de cirurgia experimental (CIEX-Unb) pela paciência em me ensinar nos os cuidados essenciais aos animais e pela ajuda no desenvolvimento de um protocolo que fosse o mais adequado para o estudo.

Aos **meus queridos alunos**, que são o verdadeiro motivo dos meus estudos. Obrigado por confiar no meu trabalho e por apoiar o meu crescimento. Nada é melhor do que ver o sorriso estampado no rosto de vocês. Eu sei o quanto é difícil nos dias atuais convencer as pessoas sobre a manutenção de hábitos de vida saudáveis, mas vocês sempre estiveram dispostos a me ouvir e também a falar algo que me fazia aprender. As conquistas de vocês são as minhas conquistas também. Vocês são os principais motivos de eu estar sempre buscando meu aperfeiçoamento.

A todos os meus **professores**, que me mostraram que não importava o quanto eu tivesse dificuldade em alguma coisa, se eu quisesse realmente algo, bastava trabalhar duro todos os dias que eu iria conseguir. Me ensinaram a ver as coisas de um jeito bem diferente do que a maioria das pessoas via. Me desafiaram, me confrontaram e me fizeram crescer.

A **todos os meus amigos**, que demonstraram interesse em cada uma das minhas conquistas, como se fossem de vocês. Todo o apoio e o carinho que recebi me fizeram continuar nas horas mais difíceis. Graças a vocês minhas horas de descanso foram divertidas e restauradoras. Vocês fazem eu me sentir importante.

À minha esposa **Drª Thaiene Avila Reis**, pelo companheirismo na minha vida pessoal e pelo apoio também na vida acadêmica. Obrigado pelo carinho diário, pelas conversas, pelas dicas e por sempre encontrar um jeitinho de me agradar e me deixar feliz. Sua presença na minha vida é uma dádiva que poucos vão ter um dia. Você me ensina a ser uma pessoa melhor a cada dia e faz tudo parecer mais fácil e simples.

À minha querida **mãe, Gisela Cabral Sampaio de Lacerda**, por todos os ensinamentos na formação do meu caráter. Tudo o que você fez e faz por mim, todos os dias, reflete na minha maneira de ser e agir, tanto no lado pessoal quanto profissional. Obrigado pela compreensão nos momentos de estresse e pelo incentivo, desde pequeno, em sempre seguir aquilo que eu tivesse vontade. Você sempre me apoiou em tudo e me disse para ter confiança nas minhas capacidades, pois eu sempre chegaria aonde eu quisesse.

Ao meu falecido avô, **Profº Drº Paulo Roberto Gonçalves Sampaio de Lacerda**, por todo o incentivo a minha educação e a minha formação como ser humano. Onde você estiver, saiba que você foi minha força e minha inspiração. Se eu resolvi trilhar este caminho foi porque eu acreditei que era possível. Se eu acreditei que era possível foi porque você me mostrou que o mundo podia ser muito melhor do que eu achava que era. Nunca vou esquecer de você.

Em especial, **a todos os animais envolvidos na minha pesquisa**, por comprometer a própria vida para melhorar a nossa, dos seres humanos. Além do apego emocional, eu sempre tive muito respeito e cuidado no tratamento a estes bichinhos tão indefesos. Espero que a tecnologia evolua ainda mais e o ser humano continue encontrando outras formas alternativas de fazer pesquisa.

“A ciência é o melhor instrumento para medir a nossa ignorância”.

(Paolo Mantegazza)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A obesidade é um dos maiores problemas de saúde da modernidade e está diretamente relacionada ao consumo de alimentos com alto valor energético e à inatividade física. O treinamento contínuo de intensidade moderada (MICT) e o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) são diferentes protocolos de treinamento físico que compõem o conjunto de estratégias terapêuticas na obesidade, mas seus efeitos moleculares no tecido adiposo ainda não são completamente compreendidos. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico na aptidão física relacionada à saúde, expressão de genes relacionados à termogênese e eficiência energética no tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. **MÉTODOS:** Vinte camundongos C57BL/6 foram divididos em 4 grupos para o protocolo de treinamento físico: a) Controle (CC, n=5), b) Controle-obesos (CH, n=5); c) MICT obesos (MO; n=5) e d) HIIT obesos (IN, n=5). O teste de rampa foi utilizado para determinar a velocidade e distância máxima percorridas. MICT correu a 70% máx e HIIT correu períodos de 4 min a 90% max com intervalos de 3 min 70% máx por um total de 8 semanas, 60 min/dia, 5 dias/semana. Após eutanásia, os tecidos de interesse foram coletados, pesados e armazenados. A expressão dos genes UCP1, Cidea, Prdm-16, Pgc1 α , Tmem26, Cd40, LEP e ADIPOQ foi analisada por *RT-qPCR*. **RESULTADOS:** Ao final do protocolo de treinamento físico, os grupos MO e IN ganharam 72% menos peso que o grupo controle. MO melhorou a distância percorrida no teste de rampa (209,8 \pm 80,2 m) em comparação ao CH (54,8 \pm 30,3 m) e CC (118,2 \pm 28,5 m) ($p < 0,01$). A massa do TAM do grupo IN (10,0 \pm 1,4 mg/g) foi significativamente maior (+59%) do que o CC (6,3 \pm 1,4 mg/g) ($p \leq 0,05$), mas a expressão da UCP1 no TAM dos grupos IN (0,80 \pm 0,09) e MO (0,82 \pm 0,09) foi significativamente menor que CH (2,24 \pm 0,28) ($p \leq 0,05$). Não houve diferença na expressão de UCP1 no TAB (IN: 0,37 \pm 0,23; MO: 0,35 \pm 0,25; CH: 0,15 \pm 0,05 e CC: 1,04 \pm 0,01, $p > 0,05$) assim como em outros genes relacionados à termogênese. No entanto, no IN, houve uma maior expressão de Tmem26 (3,94 \pm 1,47 vs 1,08 \pm 0,03) ($p \leq 0,05$) e uma expressão de LEP semelhante em comparação ao CC ($p > 0,05$). A distância percorrida no teste de rampa teve uma correlação negativa ($r = -0,645$) com a transcrição de UCP1 no TAM ($p < 0,01$) e a massa do TAB subcutâneo teve uma correlação negativa ($r = -0,764$) com a expressão de UCP1 no TAB ($p < 0,001$). **CONCLUSÕES:** O treinamento físico

melhorou a aptidão física e atenuou o ganho de peso em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, especialmente no MICT. A maior aptidão física esteve relacionada a menor a expressão de UCP1 no TAM. Da mesma forma, a maior massa do TAM pode estar relacionada à diminuição da expressão de UCP1 neste tecido. Adicionalmente, HIIT esteve relacionado a indução de adipócitos bege no TAB.

Descritores: Treinamento físico; obesidade, termogênese; treinamento intervalado de alta intensidade; tecido adiposo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Obesity is one of the major health problems of modernity and is directly related to the consumption of high-energy foods and physical inactivity. Moderate-intensity continuous training (MICT) and High-intensity interval training (HIIT) are different exercise training protocols that comprise the set of therapeutic strategies in obesity, but their molecular effects on adipose tissue are still not fully understood. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of different exercise training protocols on health-related physical fitness, expression of genes related to thermogenesis and energetic efficiency of brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) in diet-induced obese mice. **METHODS:** Twenty C57BL/6 mice were divided in 4 groups for the experimental protocol: a) Control (CC, n = 5), b) Obese control (CH, n = 5); c) Obese MICT (MO; n = 5) and d) Obese HIIT (IN, n = 5). The ramp test was used to determine the maximum speed and distance runned. MICT runned continuously at 70%max speed and HIIT runned bouts of 4 min at 90%max speed with intervals of 3 min at 70%max speed for 8 weeks, 60 min/day, 5 days/week. After euthanasia, tissues were collected, weighed and stored. The gene expression of UCP1, Cidea, Prdm-16, Pgc1 α , Tmem26, Cd40, LEP e ADIPOQ was analysed by RT-qPCR. AMPK protein expression was analysed by Western Blotting. **RESULTS:** After the experimental protocol, both MO and IN gained 72% less weight than CC. MO improved the distance runned in ramp test (209.8 ± 80.2 m) compared to CH (54.8 ± 30.3 m) and CC (118.2 ± 28.5 m) ($p < 0.01$). The BAT mass of IN (10.0 ± 1.4 mg/g) was significantly higher (+59%) than the CC (6.3 ± 1.4 mg/g), but the expression of UCP1 on BAT in IN (0.80 ± 0.09) and MO (0.82 ± 0.09) groups were significantly lower than CH (2.24 ± 0.28) ($p \leq 0.05$). There was no difference between groups of UCP1 expression in WAT (IN: 0.37 ± 0.23 ; MO: 0.35 ± 0.25 ; CH: 0.15 ± 0.05 and CC: 1.04 ± 0.01), as well as in other genes related to thermogenesis. However, in IN, there was a greater expression of *Temem26* (3.94 ± 1.47 vs 1.08 ± 0.03) and a similar LEP expression compared to CC ($p > 0.05$). The distance runned on the ramp test had a negative correlation ($r = -0.645$) with UCP1 mRNA in BAT ($p < 0.01$) and the subcutaneous WAT mass had a negative correlation ($r = -0.764$) with UCP1 mRNA in WAT. **CONCLUSIONS:** Exercise training improved physical fitness and attenuated weight gain in diet-induced obese mice, especially in the MICT. The higher the physical fitness, was related to the lower expression of UCP1 in BAT.

Similarly, the greater mass of the BAT may be related to the reduction of UCP1 in this tissue. Additionally, HIIT was related to inducing beige adipocytes in WAT.

Keywords: Exercise training, obesity; thermogenesis; High-Intensity Interval Training; adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da aptidão física relacionados à saúde e ao desempenho, adaptado de Caspersen, Powell & Christenson (1985) (17).....	24
Figura 2. Exercício físico altera a expressão de genes e proteínas relacionadas ao metabolismo através das miocinas. Figura adaptada de (19).	25
Figura 3. Origem dos adipócitos marrom, branco e bege e do músculo esquelético. Adaptado de (24).....	27
Figura 4. Alojamento dos animais no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.	36
Figura 5. Esquema ilustrativo do delineamento experimental do estudo realizado em um período de 32 semanas.....	38
Figura 6. Esteira para camundongos (AVS Projetos®).	39
Figura 7. Camundongo com obesidade induzida por dieta hiperlipídica da linhagem C57BL6 antes da eutanásia (A) e após eutanásia (B). Tecido adiposo branco visceral (depósito epididimal), testículos e epidídimos de animal obeso (grupo CH) após eutanásia, sendo preparados para pesagem a ser realizada em balança de alta precisão.....	41
Figura 8. Ganho de peso entre grupos, antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.	48
Figura 9. Ganho de peso ao final do protocolo de treinamento físico, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média \pm EPM.	51
Figura 10. Distância percorrida e tempo dispendido diariamente entre os grupos MO e IN, durante os protocolos de treinamento. Dados apresentados como média \pm EPM.	52
Figura 11. Diferença da distância percorrida no teste de esteira entre os grupos submetidos aos protocolos de treinamento. Dados apresentados como média \pm EPM.	53
Figura 12. Massa de todos os tecidos de interesse coletados após o final do protocolo de treinamento físico (Tecido Adiposo Marrom (TAM) (A); TAB subcutâneo (B); TAB visceral – depósito epididimal (C); TAB visceral – depósito retroperitoneal (D); Gastrocnêmio (E); Sóleo (F); Testículo (G); Coração (H); Fígado (I)), corrigidas para o peso do animal (mg/g). Dados apresentados como média \pm EPM.	56
Figura 13. Correlação da massa do músculo gastrocnêmio (mg/g) com a massa do testículo (mg/g) considerando os animais de todos os grupos (n=20).	57
Figura 14. Correlação da transcrição de UCP1 no tecido adiposo marrom com o delta da distância percorrida no teste de rampa (m) considerando os animais de todos os grupos (n=20).	58
Figura 15. Correlação do tecido adiposo branco subcutâneo (mg/g) com a transcrição de UCP1 no tecido adiposo branco considerando os animais de todos os grupos (n=20).....	58

Figura 16. Expressão da proteína AMPK fosforilada (A), total (B) e relação entre fosforilada/total (C) no músculo gastrocnêmio, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média \pm EPM.	60
Figura 17. Expressão da proteína AMPK fosforilada (A), total (B) e relação entre fosforilada/total (C) no músculo sóleo, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média \pm EPM.	61
Figura 18. Expressão relativa do RNAm da UCP1 no tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média \pm EPM.	62
Figura 19. Expressão relativa do RNAm da UCP1 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	63
Figura 20. Expressão relativa do RNAm da Cidea no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	64
Figura 21. Expressão relativa do RNAm da Prdm-16 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	65
Figura 22. Expressão relativa do RNAm da Pgc1 α no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	65
Figura 23. Expressão relativa do RNAm da Cox5b no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	66
Figura 24. Expressão relativa do RNAm da Tmem26 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	68
Figura 25. Expressão relativa do RNAm da Cd40 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	69
Figura 26. Expressão relativa do RNAm da LEP no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	70
Figura 27. Expressão relativa do RNAm da ADIPOQ no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distância média percorrida semanalmente pelos grupos que realizaram protocolo de treinamento.....	40
Tabela 2. Consumo médio de água e dieta antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.	47
Tabela 3. Variação do peso dos animais antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.	48
Tabela 4. Consumo de água e dieta durante o período de treinamentos físicos. Dados apresentados como média \pm EPM.	49
Tabela 5. Variação do peso dos animais durante o período de treinamentos físicos. Dados apresentados como média \pm EPM.	50
Tabela 6. Comparação do tempo e da distância percorrida entre os protocolos de treinamento. Dados apresentados como média \pm EPM.	51
Tabela 7. Distância percorrida no teste de esteira. Dados apresentados como média \pm EPM.....	53
Tabela 8. Massa dos tecidos coletados pós eutanásia. Dados apresentados como média \pm EPM.....	57
Tabela 9. Expressão da proteína AMPK no músculo. Dados apresentados como média \pm EPM.....	61
Tabela 10. Expressão dos genes relacionados a termogênese no tecido adiposo marrom e branco entre os grupos de animais obesos, considerando o grupo controle-obesos (CH) como calibrador. Dados apresentados como média \pm EPM...	72
Tabela 11. Expressão dos genes relacionados a termogênese no tecido adiposo marrom e branco entre os grupos, considerando o grupo controle (CC) como calibrador. Dados apresentados como média \pm EPM.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSM	<i>American College of Sports Medicine</i> (Colégio Americano de Medicina do Esporte)
AHA	<i>American Heart Association</i> (Associação Americana do Coração)
AMPK	<i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> (Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise da Variância)
bpm	batimentos por minuto
CIEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
Cox5b	Citocromo C Oxidase, subunidade b
DHL	Dieta Hiperlipíca
EPM	Erro Padrão Médio
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
HIIT	<i>High Intensity Interval Training</i> (Treinamento Intervalado de Alta Intensidade)
IMC	Índice de Massa Corporal
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormônio Luteinizante)
mA	miliampères
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> (Proteína Quimioatratante de Monócitos 1)
MET	<i>Metabolic Equivalent</i> (Equivalente Metabólico)
MICT	<i>Moderate Intensity Continuous Training</i> (Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Método de Reação em Cadeia de Polimerase)
Pgc1 α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha</i> (Coativador 1-Alpha do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Gama)
rpm	Rotações por Minuto
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i> (proteína desacopladora 1)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBESIDADE	21
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO	22
1.2.1 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) e Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada (MICT).....	23
1.3 APTIDÃO FÍSICA RELACIONADA À SAÚDE	24
1.4 EXERCÍCIO FÍSICO E MARCADORES MOLECULARES.....	25
1.5 TECIDO ADIPOSEO.....	27
1.5.1 Tecido Adiposo branco (TAB).....	27
1.5.2 Tecido Adiposo Marrom (TAM).....	28
1.6 GENES.....	28
1.6.1 Genes Relacionados à Termogênese do Tecido Adiposo.....	28
1.6.1.1 UCP1	28
1.6.1.2 Prdm-16.....	29
1.6.1.3 Pgc1 α	29
1.6.1.4 Cidea	30
1.6.1.5 Cox5b	30
1.6.2 Genes Marcadores Específicos de Adipócito Bege/Marrom	30
1.6.2.1 Cd40	30
1.6.2.2 Tmem26	31
1.6.3.1 LEP (Leptina).....	31
1.6.3.2 ADIPOQ (Adiponectina).....	31
1.7 AMPK: PROTEÍNA RELACIONADA AO METABOLISMO ENERGÉTICO DO TECIDO MUSCULAR	31
2 HIPÓTESES	21

3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	35
5 MÉTODOS	36
5.1 MODELO ANIMAL	36
5.2 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS.....	36
5.3 DIETA E ÁGUA	36
5.4 DELINEAMENTO DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	37
5.5 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO	38
5.5.1 Familiarização na Esteira.....	38
5.5.2 Avaliação da Capacidade Aeróbia.....	39
5.5.3 Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada.....	39
5.5.4 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade	39
5.6 EUTANÁSIA	40
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TERMOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSEO	41
5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK.....	43
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	45
6 RESULTADOS	47
6.1 ANÁLISE FENOTÍPICA ANTES DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	47
6.1.1 Consumo de Água	47
6.1.2. Consumo de Dieta	47
6.1.3 Peso Dos Animais.....	48
6.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DURANTE O PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	49
6.2.1 Consumo De Água.....	49
6.2.2 Consumo de Dieta	49

6.2.3	Peso.....	50
6.3	PROCOLOS DE TREINAMENTO	51
6.4.	ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO TREINAMENTO.....	52
6.4.1	Distância Percorrida	52
6.5	ANÁLISE DESCRITIVA E INFERENCIAL DOS TECIDOS COLETADOS PÓS EUTANÁSIA.....	53
6.5.1	Tecido Adiposo Marrom.....	54
6.5.2	Tecido Adiposo Subcutâneo	54
6.5.3	Músculo Gastrocnêmio	54
6.5.4	Coração	54
6.5.5	Testículos	55
6.5.6	Outros tecidos.....	55
6.5.7	Correlações	57
6.6	ANÁLISE INFERENCIAL DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK NO TECIDO MUSCULAR	59
6.6.1	Músculo Gastrocnêmio	59
6.6.2	Músculo Sóleo	60
6.7	ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO ADIPOSEO.....	62
6.7.1	Análise Da Transcrição Gênica De Genes Termogênicos No Tecido Adiposo Marrom	62
6.7.2	Análise Da Expressão De Genes Termogênicos No Tecido Adiposo Branco	63
6.7.2.1	Expressão gênica da UCP1 No Tecido Adiposo Branco Subcutâneo (Depósito Inguinal)	63
6.7.2.2	Expressão Dos Genes Cidea, <i>Prdm-16</i> E <i>Pgc1α</i> No Tecido Adiposo Branco Subcutâneo (Depósito Inguinal)	64
6.7.2.3	Análise de Gene Marcador de Biogênese Mitocondrial no Tecido Adiposo Branco	66
6.7.2.4	Análise Dos Genes Seletivos De Adipócitos Bege No Tecido Adiposo Branco	67

6.7.2.5 Análise da Expressão de Genes relacionados a hormônios produzidos pelo tecido adiposo.....	69
7 DISCUSSÃO	73
7.1 GANHO DE PESO	73
7.2 APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA.....	74
7.3 TECIDO ADIPOSEO.....	77
7.4 TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO	82
7.5 LIMITAÇÕES.....	85
8 CONCLUSÕES	87
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A – GRUPO INATIVIDADE FÍSICA (IF)	98
APÊNDICE B – ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA TOTAL PLASMÁTICA.....	103
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma condição de estresse metabólico, hoje considerada um dos maiores problemas de saúde e que está diretamente relacionada ao consumo de alimentos com alto valor energético, à falta de atividade física regular e ao comportamento sedentário (1,2). Alguns estudos têm associado o excesso de tecido adiposo com doenças cardiovasculares, alterações metabólicas e hormonais (3,4). Ainda assim, a quantidade de pessoas com sobrepeso e obesidade vem crescendo bastante nas últimas décadas em vários países do mundo, incluindo o Brasil (5). A urbanização das cidades e a vida moderna levou as pessoas ao consumo de alimentos processados e com grandes quantidades de gordura, contando para uma estimativa de aumento de 25-30% no IMC da população mundial. Outra consequência da modernidade foi a redução do gasto energético diário ocasionada pelo baixo nível de atividade física da população, que passa muitas horas em trabalhos com pouca demanda física. Estes fatores vem influenciando este aumento crescente no número de pessoas obesas, evidenciando assim a necessidade de considerar a obesidade uma prioridade de saúde pública e buscar novas e mais eficientes abordagens para sua prevenção e tratamento (6,7).

De acordo com os dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2016, o número de pessoas com excesso de peso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) e obesidade ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), cresceu 26,3% e 60%, respectivamente, em apenas dez anos. A prevalência de sobrepeso/obesidade é maior com o aumento da idade, em pessoas com menos anos de estudo, e em indivíduos do sexo masculino (8).

Com relação a alimentação, apesar de ter sido observado um pequeno aumento de 2,2% no consumo regular de frutas e hortaliças adicionado a uma redução de 30,9% no consumo regular de refrigerantes e sucos artificiais, ainda assim acabou crescendo em 61,8% o número de pessoas diagnosticadas com diabetes. Aumentou, também, o número de pessoas diagnosticadas com hipertensão arterial, passando de 22,5% em 2006 para 25,7% em 2016. No entanto,

o acesso ao diagnóstico de diabetes e hipertensão no país ainda é desigual e, portanto, os números podem estar subestimados (8).

Surpreendentemente, em relação a atividade física, nos últimos anos houve um aumento de 30,3% em 2009 para 37,6% em 2016 na prática de atividade física no tempo livre, quando considerado o mínimo de 150 minutos de atividade física moderada por semana (8).

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO

Dentre os principais fatores que influenciam a saúde estão a genética, o ambiente e o comportamento. Como temos uma menor possibilidade de controle sobre a predisposição genética e o ambiente que nos cerca, realizar mudanças no comportamento se tornou uma das principais formas de prevenção e até mesmo de tratamento de diversas doenças, entre elas a obesidade (9). A prática de exercícios e a dieta equilibrada são as mudanças comportamentais adequadas para prevenir e tratar a obesidade, a adiposidade central, o diabetes mellitus e a hipercolesterolemia. A prática de exercício físico resulta em melhoria da saúde, qualidade de vida e diminuição da mortalidade, fato que determinou o surgimento do conceito “*Exercise is Medicine*” ou “Exercício é Remédio” (10). Como medicamento, se torna necessário desenvolver formas de prescrevê-lo para aumentar a sua utilização e eficácia, visando estratégias que incluem mudanças no comportamento e no ambiente, sem esquecer da influência dos componentes genéticos (11).

A partir da grande quantidade de evidências científicas sobre o potencial do exercício físico, surgiu a necessidade de levantar mais conhecimentos acerca da sua posologia. O Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) definiu as recomendações mínimas para a prática de exercício físico necessárias para melhorar a saúde da população em geral. Segundo essas diretrizes, todo adulto deve praticar pelo menos 150 minutos de atividade física de intensidade moderada por semana (9,12) Essas recomendações levam em consideração a importância da prática regular de exercícios físicos para prevenção de doenças crônicas de ordem metabólica, as quais podem levar a morte prematura. Apesar de ter sido observado um pequeno aumento de pessoas realizando atividade física e da melhora na qualidade dos alimentos consumidos no país, a maior parte da população ainda não consegue realizar essas recomendações mínimas e o número de pessoas com

obesidade continuou crescendo , juntamente com a prevalência de doenças metabólicas (13,14).

Este fato evidencia a natureza complexa da doença e, principalmente, a necessidade de novas estratégias que levem em consideração os hábitos de vida da modernidade, e que sejam mais efetivas em relação ao planejamento do programa de exercício e ao tempo gasto.

1.2.1 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) e Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada (MICT)

As variáveis mais importantes no planejamento e execução de um programa de exercícios físicos são o volume e a intensidade. O MICT pode influenciar positivamente os parâmetros metabólicos e funcionais, mas o aumento do volume de treinamento nem sempre leva a ganhos na aptidão cardiorrespiratória de forma satisfatória, principalmente em atletas. Com isso, foi levantada a hipótese de se aumentar a intensidade assim também como a necessidade de desenvolver diferentes programas de treinamento com tempos de intervalos específicos, chamados de HIIT (15).

Nos últimos anos, o HIIT surgiu como uma forma de treinamento capaz de promover maiores ganhos na capacidade aeróbia, em comparação com MICT (15). Além disso, uma revisão sistemática observou que o HIIT também teria um importante papel na prevenção e tratamento de doenças endócrino-metabólicas e na melhora da aptidão física relacionada à saúde (16). Segundo os autores, em comparação ao treinamento contínuo, além de melhorar a capacidade aeróbia, o HIIT também aumentou a expressão do coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (Pgc1 α), uma enzima essencial na regulação do metabolismo oxidativo do tecido muscular esquelético. O HIIT também teria o potencial de regular a expressão de genes e proteínas em órgãos como o fígado, músculo esquelético e o tecido adiposo, além de ser protetor contra desordens relacionadas com os fatores de risco da síndrome metabólica.

1.3 APTIDÃO FÍSICA RELACIONADA À SAÚDE

Aptidão física é definida classicamente como um “conjunto de atributos que as pessoas têm ou obtêm”. Neste caso, estes atributos têm influência direta da realização de exercícios físicos, quando a intenção é a melhora dos seus componentes, sendo de maior interesse aqueles relacionados à saúde (17). A aptidão física foi classicamente dividida entre aquela relacionada à saúde e ao desempenho, de acordo com os seus componentes demonstrados na Figura 1.



Figura 1 - Componentes da aptidão física relacionados à saúde e ao desempenho, adaptado de Caspersen, Powell & Christenson (1985) (17).

Neste sentido, um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que os componentes da aptidão física relacionada com a saúde podem ter um papel importante na predição dos fatores de risco para síndrome metabólica. Foram avaliados 69 agentes de segurança de meia idade entre os quais se verificou que a proporção de pessoas com síndrome metabólica foi 3,4 vezes maior naqueles que tinham uma baixa capacidade cardiorrespiratória. Além disso, a chance de ter síndrome metabólica aumentou em 23% a cada unidade de aumento do índice de massa corporal (IMC), mostrando que até mesmo pequenas reduções no peso podem resultar na diminuição da prevalência de síndrome metabólica (18) e, por consequência, no risco cardiovascular.

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO E MARCADORES MOLECULARES

Uma revisão sistemática com meta-análise, realizada em 2013, observou a eficácia do exercício comparativamente a diversas drogas usadas no tratamento e prevenção de doenças metabólicas, como diabetes, hipertensão arterial e hipercolesterolemia. Os resultados indicam que, em diversos casos, os efeitos do exercício são similares ou melhores do que medicamentos tradicionais atualmente em uso pela população. As evidências atuais têm inclusive levado alguns pesquisadores a comparar o exercício a um medicamento eficaz para diversos tipos de doenças, cunhando a expressão “*Exercise is a real poypill*”, capaz de atuar em diversas vias moleculares, como demonstrado na Figura 2 (19).

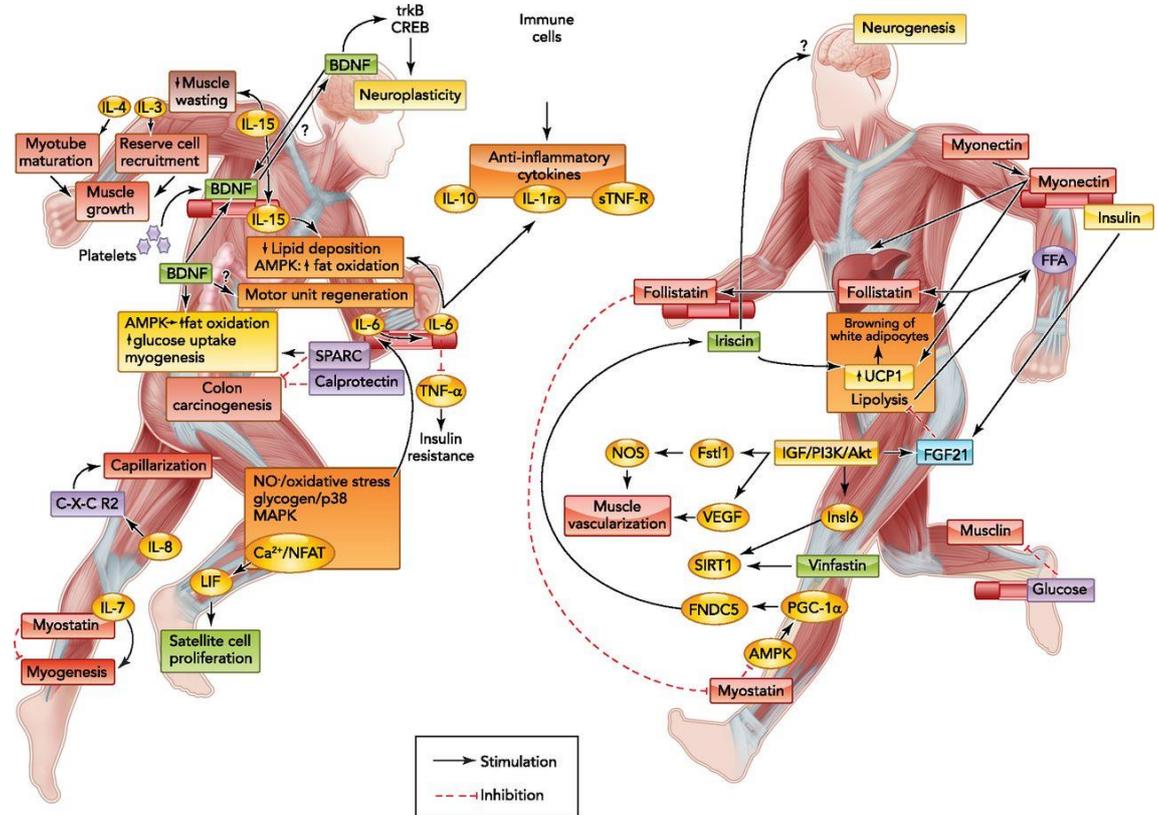


Figura 2 - Exercício físico altera a expressão de genes e proteínas relacionadas ao metabolismo através das miocinas. Figura adaptada de (19).

Ainda, de acordo com esta mesma revisão sistemática, pode-se destacar a função do tecido muscular como o possível fabricante dessa “pílula polivalente” capaz de aprimorar os processos metabólicos. A contração muscular pode produzir centenas de moléculas derivadas do tecido muscular esquelético, chamadas de miocinas. Pode ser observado na Figura 2 que as miocinas exercem efeitos em

diversos órgãos e tecidos, entre eles, o tecido adiposo. A contração muscular é um estímulo com potencial capaz de gerar adaptações fisiológicas, no entanto, a base molecular dos efeitos metabólicos e terapêuticos ainda permanece uma área que necessita de aprofundamento. Aparentemente, as vias relacionadas à resposta ao exercício são inúmeras e muito complexas. Algumas pesquisas têm tentado imitar os efeitos do exercício como se ele fosse um fármaco, mas seus efeitos vão além das abordagens monoterapêuticas que conhecemos (20).

A irisina é um exemplo de uma proteína descoberta recentemente que foi denominada como “pílula do exercício”. A irisina seria capaz de aumentar o gasto energético e diminuir a resistência à insulina, através da ativação do tecido adiposo no sentido de induzir o seu “amarronzamento”. A descoberta inicial da irisina está relacionada ao aumento na sua expressão devido a uma resposta da expressão suprafisiológica da proteína *Pgc1- α* . Estudos posteriores demonstraram que a irisina estaria elevada em seres humanos e animais submetidos ao treinamento físico, mas, quando bloqueada, ela impedia o remodelamento do tecido adiposo branco (TAB) (21).

Os adipócitos são as células do tecido adiposo e podem possuir características muito distintas que dependem de sua linhagem embriogênica. Os adipócitos marrons clássicos originam-se de células precursoras que expressam o fator miogênico 5 (*Myf5-positivos*), da mesma forma acontece com os miócitos (células do tecido muscular). Por outro lado, os adipócitos branco e bege originam-se de precursores *Myf5-negativos*. O desenvolvimento de uma célula de um adipócito marrom depende, por exemplo, da expressão aumentada de *Prdm-16* (*PRD1-BF1-RIZ1* contendo o domínio 16) em precursores *Myf5-positivos*, enquanto o desenvolvimento de um adipócito bege pode depender de sua exposição à fatores como o frio ou o exercício (22,23). Esquema representado na Figura 3.

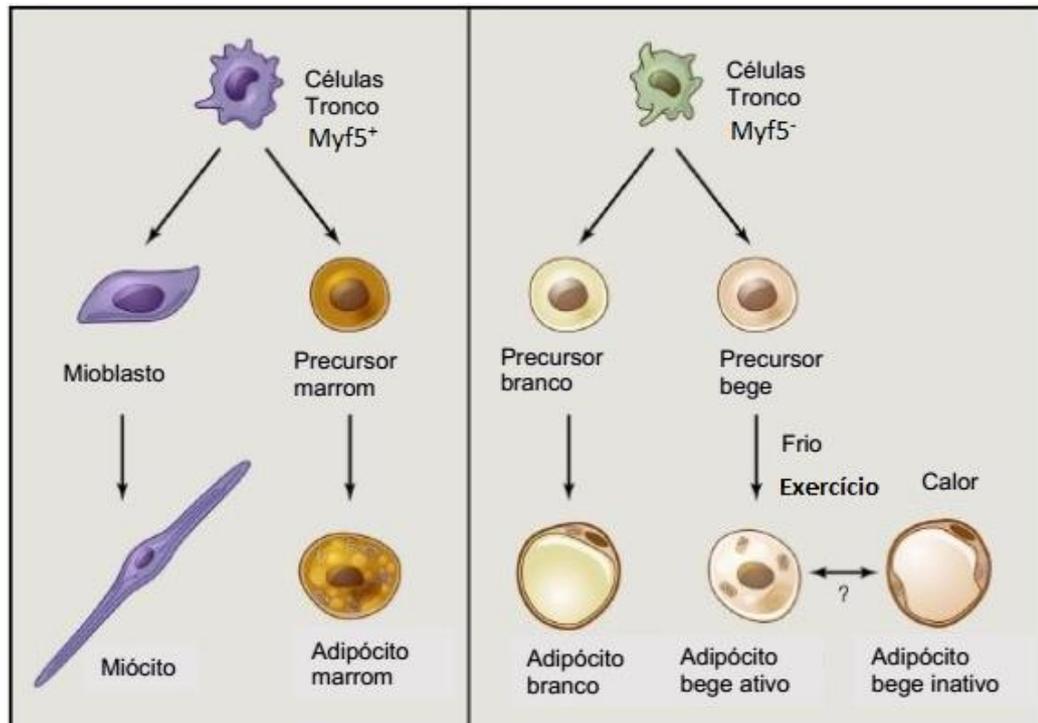


Figura 3. Origem dos adipócitos marrom, branco e bege e do músculo esquelético. Adaptado de (24).

1.5 TECIDO ADIPOSEO

1.5.1 Tecido Adiposo branco (TAB)

Tanto em estudos experimentais quanto em seres humanos, o tecido adiposo sempre esteve relacionado à sua principal função que é o armazenamento de energia. Em situações onde há excesso de energia consumida pela dieta, o tecido adiposo armazena os ácidos graxos. Por outro lado, em situações onde existe a prática de exercício físico prolongado ou de alta intensidade, os ácidos graxos são liberados pelo tecido adiposo para serem utilizados em forma de adenosina trifosfato (ATP) pelo tecido muscular esquelético, em um processo chamado de lipólise. Dependendo da duração do exercício, a lipólise pode aumentar em mais de cinco vezes para suprir a demanda de energia, o que envolve uma articulação complexa entre sinalizações intracelulares, neurais e endócrinas. Interessantemente, a capacidade de lipólise parece ser alterada também devido ao exercício crônico, assim como ser específica para cada tipo de adipócito (25), se marrom, branco ou bege.

1.5.2 Tecido Adiposo Marrom (TAM)

O tecido adiposo marrom (TAM) é caracterizado hoje como um tecido endócrino, sendo apresentado, portanto, como um potencial alvo terapêutico no combate de doenças relacionadas à obesidade. Embora tenha sido descoberto inicialmente em pequenos mamíferos e bebês recém-nascidos, o TAM tem sido fonte de muitas pesquisas realizadas nos últimos anos porque ele tem apresentado efeitos positivos na regulação do metabolismo, como o aumento de até 30% no gasto energético, se completamente ativado (26).

O TAM é considerado um órgão com alta capacidade termogênica, relacionada a uma resposta adaptativa a estímulos externos, principalmente ao frio. As respostas fisiológicas de adaptação ao frio estão classificadas de acordo com a presença ou ausência de tremor. É possível que o tremor ao frio e o exercício físico estejam intimamente relacionados, sendo eles potenciais dissipadores de energia em forma de calor, provavelmente devido ao fato de que ambos envolvem contração muscular (27)

Portanto, além do frio, uma outra forma de ativar a termogênese é o exercício físico. Uma revisão sistemática realizada em 2017 avaliou os efeitos do exercício físico regular na expressão de genes e proteínas do TAM. A partir de 9 estudos selecionados, os autores concluíram que o exercício físico regular não representaria um estímulo suficiente para induzir a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) no TAM em animais saudáveis com peso normal. Entretanto, devido a multiplicidades de protocolos, ainda são necessários mais estudos para avaliar a influência do exercício físico no TAM em condições específicas como em presença de dieta hiperlipídica, assim como na possibilidade de transformar o TAB em bege (28,29).

1.6 GENES

1.6.1 Genes Relacionados à Termogênese do Tecido Adiposo

1.6.1.1 UCP1

A capacidade de dissipação de energia em forma de calor do TAM é mediada pela expressão e atividade da UCP1. A UCP1 é um transportador mitocondrial do

tecido adiposo termogênico, responsável por dissipar a energia química resultante do potencial de membrana mitocondrial na forma de calor (30,31).

No TAB, essa capacidade termogênica induzível foi descrita recentemente, após determinados estímulos, e foi caracterizada pela presença de gotículas lipídicas multiloculares, alto teor de mitocôndrias e expressão de genes relacionados à termogênese, característicos do adipócito marrom, como o que codifica a UCP1 (32). Estas células foram inicialmente denominadas adipócitos marrons induzíveis (recrutáveis) ou adipócitos bege ou descritas com o fenótipo de “amarrozamento” do TAB, por apresentarem muitas das características morfológicas e moleculares dos adipócitos marrons clássicos (33). Apesar da semelhante capacidade termogênica, adipócitos bege e marrons clássicos expressam assinaturas genéticas diferentes e características moleculares distintas (34), devendo ser considerados como dois tipos diferentes de células termogênicas. Dessa forma, uma maior expressão da UCP1 no TAB e TAM, pode indicar um efeito positivo na regulação do metabolismo energético.

1.6.1.2 Prdm-16

Existe um número muito pequeno de marcadores termogênicos específicos que indicam diferenciação da gordura marrom expresso em pré-adipócitos brancos, entre eles a proteína do domínio PR contendo 16 (Prdm-16). A Prdm-16 tem uma função reguladora dominante e ativa um amplo programa que diferencia a linhagem celular muscular em célula de TAM. Sua expressão está relacionada a alta taxa de consumo de oxigênio, característica essencial da gordura marrom (35).

1.6.1.3 Pgc1 α

A proteína coativadora do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma 1 α (Pgc1 α) também exerce seus efeitos regulatórios na atividade termogênica e tem função essencial na respiração celular mediada pela UCP1, uma vez que sua deleção reduz drasticamente o AMP cíclico (36). Ela é uma proteína acessória, inicialmente identificada como um coativador do PPAR γ e expressa principalmente no TAM. No entanto, sua expressão pode ser induzida durante a diferenciação de adipócitos brancos ou até mesmo suprimida em obesos. Estudos sugerem que o seu papel vai além de promover a termogênese induzida pelo frio,

controlando também a biogênese mitocondrial e no metabolismo oxidativo em camundongos e seres humanos (37).

1.6.1.4 Cidea

O gene ativador de morte celular (Cidea) é considerado uma proteína mitocondrial altamente expressa no tecido adiposo. No TAM, a Cidea regula negativamente a atividade da proteína UCP1. No TAB, ela tem como principal função a regulação da deposição de triglicérides nos adipócitos e em outros tipos de células, além de se correlacionar positivamente com a sensibilidade à insulina em obesos (38).

1.6.1.5 Cox5b

O citocromo C oxidase da subunidade 5B (Cox5b) é uma enzima relacionada a cadeia respiratória mitocondrial. A expressão de genes termogênicos no tecido adiposo é aumentada pela indução ao frio, mas também pode ter relação com o exercício físico. O exercício aumenta a secreção do hormônio irisina no tecido muscular, o que também aumenta de forma robusta a expressão da proteína Cox5b, induzindo ao amarronzamento do TAB (39).

1.6.2 Genes Marcadores Específicos de Adipócito Bege/Marrom

1.6.2.1 Cd40

O cluster de diferenciação 40 (Cd40) é um marcador seletivo de adipócitos bege, que auxilia na distinção destes para os adipócitos marrom e branco (39). Da mesma forma, o Cd40 também está envolvido nos mecanismos de resistência à insulina, os quais tem relação com a atividade de infiltração de macrófagos no tecido adiposo (40). É sugerido que a Cd40 tenha um papel no metabolismo do corpo inteiro e esteja relacionado à disponibilidade de glicose em diversos tecidos. Interessantemente, em camundongos com deleção Cd40 em situações de obesidade induzida pela dieta, foi observado um aumento da expressão gênica de enzimas reguladoras das vias energéticas, assim como um aumento da produção de glicose hepática (41).

1.6.2.2 Tmem26

Assim como o Cd40, a proteína da transmembrana 26 (Tmem26) também é um marcador seletivo de adipócitos bege e está presente em adipócitos marrom que respondem positivamente para a expressão de UCP1 (34). Perfis de adipócitos específicos da gordura marrom estão associados com a expressão de Tmem26, o que sugere que essas linhagens de adipócitos possam coexistir em um mesmo local (42). No entanto, pode haver muita heterogeneidade entre os tecidos (39). Em camundongos, o Tmem26 está expresso em maiores concentrações no TAB, sendo sugerido como um bom marcador de células de tecido adiposo bege (43).

1.6.3 Genes Marcadores de Hormônios Secretados pelo Tecido Adiposo

1.6.3.1 LEP (Leptina)

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo, sendo sua principal função a manutenção do peso corporal, pois ele é um dos principais regulares do apetite (44). No entanto, indivíduos obesos produzem uma grande quantidade deste hormônio, que nem sempre é acompanhada da redução do apetite, sugerindo uma resistência a ação deste hormônio. Baixas concentrações de leptina estariam relacionadas à estado sistêmico de déficit de energia enquanto altas concentrações estão relacionadas a doenças metabólicas e obesidade (45).

1.6.3.2 ADIPOQ (Adiponectina)

A adiponectina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e que tem relação direta com a sensibilidade a insulina e eficiência energética. Mais especificamente, a adiponectina age na oxidação de ácidos graxos e no aumento de AMPK no músculo (46).

1.7 AMPK: PROTEÍNA RELACIONADA AO METABOLISMO ENERGÉTICO DO TECIDO MUSCULAR

A 5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) é uma enzima ativada por miocinas que tem papel fundamental na homeostase energética de diversos tecidos e sua ativação é inversamente proporcional ao conteúdo de glicogênio, sendo considerada, portanto, um sensor de energia. A ativação da AMPK pode ocorrer em alguns estados de déficit de trifosfato de adenosina (ATP), como após estresse por calor, treinamento excessivo, hipóxia/isquemia e fome. Quando as

concentrações de creatina fosfato e ATP diminuem, as de creatina fosfato (CP) e de monofosfato de adenosina (AMP) aumentam. O aumento na relação AMP/ATP pode então ativar a AMPK agudamente. Além disso, a ativação da AMPK nos tecidos periféricos parece neutralizar muitas das anormalidades celulares observadas em modelos animais da síndrome metabólica, incluindo resistência à insulina, inflamação e deposição de lipídios. Por outro lado, sua desregulação pode contribuir para essas anormalidades. AMPK é, portanto, capaz de facilitar a biogênese mitocondrial do músculo esquelético e regular o estado energético das células musculares esqueléticas (47).

As mitocôndrias são as geradoras de energia da célula e produzem ATP através de duas formas: da utilização do oxigênio proveniente do ambiente (respiração celular) ou por meio do ácido pirúvico, resultante da quebra da glicose. As fibras tipo 2 são chamadas de fibras glicolíticas pois possuem um baixo número de mitocôndrias. Por este motivo, essas fibras são mais suscetíveis a falta de energia (mudanças bruscas na relação de AMP/ATP), o que faz com que aumente a fosforilação (ativação) de AMPK, em comparação com as fibras tipo 1 (48).

As fibras musculares com características de contração lenta apresentam uma maior quantidade de energia em forma de triglicerídeos em comparação com as fibras musculares de características rápidas, indicando que o tipo de fibra está relacionado ao acúmulo de triglicerídeo intramuscular. Em nível molecular, alguns genes têm impacto considerável no metabolismo dos lipídeos do músculo esquelético, incluindo a enzima AMPK. A ativação da AMPK aumenta o nível de captação de glicose no músculo esquelético e, conseqüentemente, aumenta a oxidação lipídica. Por outro lado, a desativação de AMPK reduz a oxidação de ácidos graxos e aumenta o acúmulo de lipídios no músculo esquelético e, conseqüentemente, eleva os níveis de triglicérides (48).

É possível que o exercício físico seja o mais poderoso ativador da AMPK e um modelo único para estudar seus muitos papéis fisiológicos. A AMPK é considerada como reguladora central da captação de glicose muscular durante o exercício e está envolvida na regulação da transcrição gênica muscular, influenciando diretamente na sensibilidade à insulina. No entanto, não é qualquer tipo de exercício que ativa a AMPK. A ativação da AMPK é dependente da intensidade do exercício. Além da intensidade do exercício, a magnitude da ativação

da AMPK durante o exercício também depende do conteúdo de glicogênio inicial e específico daquele músculo (49).

A AMPK seria ativada agudamente em exercícios com intensidade alta ou de longa duração. Em estudos realizados com animais, sua ação nos tecidos periféricos pode ajudar no combate a obesidade, síndrome metabólica e na resistência à insulina. Apesar de ter influência no metabolismo dos lipídeos, ainda não está clara qual sua relação com o aumento do gasto energético (50). No exercício realizado com intensidade alta, assim como de intensidade mais baixa mas por um tempo prolongado, também pode haver uma depleção das reservas de ATP do músculo, aumentando a ativação desta enzima que converte AMP, a AMPK (51).

Já foi relatado que, em situações de obesidade, com e sem diabetes, pode haver uma diminuição da atividade da atividade da AMPK no músculo, em comparação com ativação de indivíduos normais, e a razão para a diferença entre essas populações ainda não foi esclarecida. Da mesma forma, existe a suposição de que, em pessoas sedentárias, a falta de ativação da AMPK poderia ter consequências a longo prazo para a função mitocondrial, além de outros eventos que levam à disfunção celular e doenças associadas (50).

No estudo transversal de Taylor e colaboradores (2016), verificou-se o efeito de dois protocolos de exercício intenso (intervalado 4x30 s ou contínuo 1x2 min, all-out) em homens ciclistas treinados e verificaram um aumento na ativação da AMPK de 1,6x no intervalado e 1,3x no contínuo, imediatamente após o treinamento. Entretanto, essa ativação voltou aos valores iniciais após apenas três horas (52).

Uma revisão sistemática realizada em 2009 destaca a importância da AMPK como uma enzima sinalizadora do combustível celular (mais precisamente a falta dele) e sua ativação pelo exercício físico. Apesar de ter influência no metabolismo dos lipídeos, como sua ação aguda na manutenção da do ATP através da utilização de ácidos graxos, ainda não fica claro qual sua relação direta com o aumento do gasto energético (50). Desta forma, estudos sobre a ativação da AMPK após diferentes protocolos de exercício crônico em humanos e animais obesos são ainda necessários.

3 JUSTIFICATIVA

A relevância científica e o caráter inovador do presente estudo residem na investigação e descrição, segundo nosso conhecimento ainda inédito, da expressão concomitante de diversos marcadores moleculares sabidamente importantes sobre as alterações metabólicas do tecido adiposo em diferentes protocolos de treinamento físico em associação com a dieta hiperlipídica, com potencial impacto sobre o tratamento e prevenção de comorbidades e doenças relacionadas à obesidade, os quais ainda necessitam de esclarecimentos.

Os resultados provenientes desse estudo poderão preencher lacunas na busca de melhor entendimento dos efeitos biológicos locais e sistêmicos nas interações do exercício físico, assim como também podem viabilizar a descrição do padrão de transcrição de diversos marcadores moleculares do TAM e TAB, concomitantemente, em diferentes condições biológicas (fisiológica e patológicas). Este trabalho poderá contribuir para o entendimento dos processos envolvidos, fornecendo bases para a identificação de políticas públicas que visem a diminuição do sedentarismo, assim como o possível estabelecimento de protocolos de treinamento adequados para cada desfecho de saúde pretendido.

Diversos estudos avaliaram os efeitos do treinamento físico baseados em modelos animais com obesidade devido a mutações genéticas. No entanto, este modelo não se assemelha com o que ocorre em seres humanos, tendo em vista que são raros os casos de indivíduos com alguma mutação genética que justifique por si só o desenvolvimento da obesidade. Buscamos, então, a avaliação da obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a qual se aproxima do ambiente ao qual estão submetidos os seres humanos.

Nesse sentido, observa-se ainda a carência de estudos que avaliem claramente e simultaneamente os efeitos de diferentes intensidades e protocolos de exercício sobre as condições de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, em comparação a condições controle, sobre os mecanismos moleculares no tecido adiposo, considerando também que a avaliação dos efeitos crônicos do exercício possui características diferentes da avaliação dos efeitos agudos.

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico sobre a aptidão física relacionada a saúde, assim como na expressão de genes relacionados a termogênese e a eficiência energética do tecido adiposo e tecido muscular, em um modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Caracterizar o modelo animal de indução de obesidade por dieta hiperlipídica e investigar o comportamento do peso dos animais e da massa dos tecidos, consumo alimentar e hídrico antes e após os protocolos de treinamento físico MICT e HIIT;
2. Investigar o perfil de expressão de genes relacionados a termogênese do TAM e TAB;
3. Investigar o perfil de expressão de genes seletivos de diferenciação de adipócitos bege e relacionados ao metabolismo energético no TAB, após os protocolos de treinamento físico MICT e HIIT;
4. Investigar a expressão de proteína AMPK no tecido muscular após os protocolos de treinamento físico MICT e HIIT.

5 MÉTODOS

5.1 MODELO ANIMAL

Realizou-se estudo experimental com 20 camundongos machos isogênicos, da linhagem C57BL/6. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), adquiridos mediante um laudo técnico atestando a qualidade sanitária dos animais (análise bacteriológica, bioquímica, hematológica e parasitológica).

5.2 ALOJAMENTO DOS ANIMAIS

Durante o estudo, os camundongos foram divididos em cinco gaiolas, com até 5 animais (micro isolador em estante ventilada – Alesco, SP, Brasil), mantidos em ambiente com temperatura controlada ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 19:00 h e 7:00 h), em salas de alojamento do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como demonstrado na Figura 4.



Figura 4. Alojamento dos animais no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

5.3 DIETA E ÁGUA

Os camundongos chegaram ao Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília com quatro semanas de vida e foram divididos aleatoriamente em dois grupos.

Um grupo (n=5) foi alimentado com dieta controle normolipídica AIN-93G (15,8% de lipídeos, 20,3% de proteína e 63,9% de carboidratos), formulada para as fases de crescimento, gestação e lactação de roedores, de acordo com as diretrizes AIN-93 (53).

Outros três grupos (n=15) foram alimentados com dieta hiperlipídica (57,2% de lipídeos, 15,2% de proteína e 27,6% de carboidratos) com o intuito de induzir a obesidade nos animais.

Todos os animais foram submetidos a dieta específica, desde quatro semanas de vida, período que representa o início da puberdade até o final do estudo (32 semanas de vida).

A dieta controle e a dieta hiperlipídica foram fornecidas na forma de *pellet*. A água oferecida era devidamente tratada e filtrada, própria para consumo dos animais. O acesso tanto à dieta quanto a água foi *ad libitum*.

5.4 DELINEAMENTO DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Após 20 semanas de cada dieta específica (grupo CC: dieta controle normolipídica, e grupos CH, MO e IN: dieta hiperlipídica), os camundongos, então com 24 semanas de vida, foram submetidos a quatro condições experimentais independentes:

Grupo CC (animais controle, sem indução de obesidade - dieta normolipídica –, sem treinamento físico): constituído de animais que não foram submetidos a nenhum treinamento físico, isto é, foram mantidos apenas com sua mobilidade espontânea.

Grupo CH (animais induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica, sem treinamento físico): constituído de animais obesos que não sofreram nenhum tipo de intervenção física, isto é, foram mantidos apenas com sua mobilidade espontânea.

Grupo MO (animais induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica e com treinamento contínuo de intensidade moderada – MICT): constituído de animais obesos que foram submetidos a treinamento contínuo de intensidade moderada.

Grupo IN (animais induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica e com treinamento intervalado de alta intensidade – HIIT): constituído de animais obesos que foram submetidos ao treinamento intervalado de alta intensidade.

Os protocolos experimentais de intervenção com treinamentos físicos, bem como respectivos controles sem atividade física (grupos CC e CH) foram realizados concomitantemente e tiveram duração de 8 semanas.

A representação do delineamento do estudo pode ser observada na Figura 5.



Figura 5. Esquema ilustrativo do delineamento experimental do estudo realizado em um período de 32 semanas.

5.5 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO

5.5.1 Familiarização na Esteira

Uma semana antes de iniciar o teste de capacidade aeróbia, todos os animais foram submetidos à familiarização ao treinamento físico em esteira ergométrica própria para estudos experimentais em camundongos, durante cinco dias (Figura 6). A familiarização ocorreu diariamente, utilizando uma velocidade de 6 m/min, durante 5 min, com uma inclinação constante de 25° (adaptada de 54, 55).

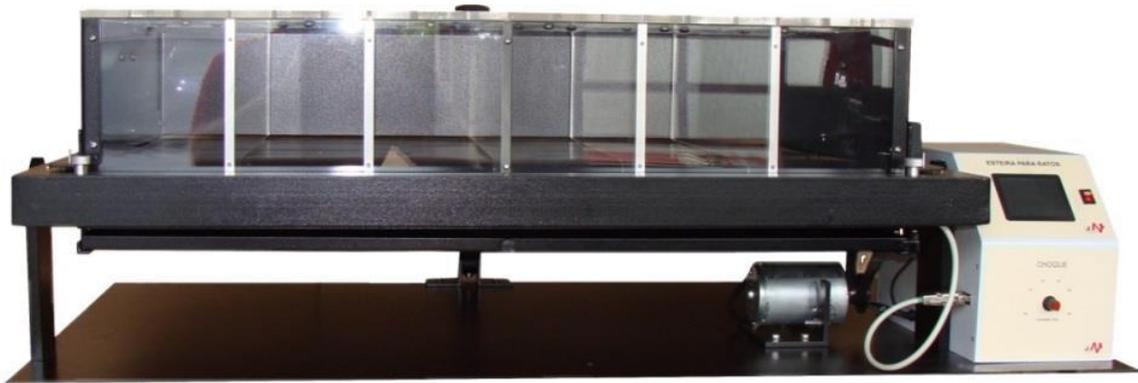


Figura 6. Esteira para camundongos (AVS Projetos®).

5.5.2 Avaliação da Capacidade Aeróbia

Após uma semana de familiarização, os animais foram submetidos a um protocolo de rampa para a avaliação da capacidade aeróbia. Para realização do protocolo de rampa, foi utilizada uma velocidade inicial de 6 m/min, seguida de aumentos de 2 m/min a cada 2 min, com inclinação constante de 25°. O avaliação foi interrompida no momento que o animal não era mais capaz de continuar correndo (adaptada de 54,55). No momento da avaliação, foi computada a maior distância, velocidade e tempo de cada animal. Os resultados obtidos foram utilizados para o planejamento dos protocolos de treinamento. Esta avaliação foi realizada antes e após oito semanas do treinamento.

5.5.3 Treinamento Contínuo de Intensidade Moderada

Após aquecimento de 5 min (em carga de 50% da velocidade máxima atingida no teste), o animal correu continuamente a 70% da velocidade máxima atingida pelo seu grupo na avaliação da capacidade aeróbia, durante 60 min, em 5 dias por semana, por 8 semanas.

5.5.4 Treinamento Intervalado de Alta Intensidade

Após aquecimento de 5 min (em carga de 50% do máximo previsto), foram realizadas corridas de alta intensidade, a 85-90% da velocidade máxima atingida no protocolo de rampa da esteira, durante 4 min com intervalo de recuperação ativa de 3 min (70% máximo) entre as corridas, com duração total de no máximo 60 min em 5 dias por semana, por 8 semanas.

O tempo de treinamento dos animais foi reduzido em 50% na primeira semana de treinamento para evitar desgaste físico excessivo dos animais em ambos os grupos. Por outro lado, a velocidade máxima foi aumentada ao final da quarta semana em mais 2 m/min para ambos os grupos, com intuito de garantir as adaptações decorrentes do treinamento. As duas estratégias resultaram em mudanças na distância total percorrida diariamente nas referidas semanas, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Distância média percorrida semanalmente pelos grupos que realizaram protocolo de treinamento.

Semana	MO (m)	IN (m)
1	236,7 ± 17,3	236,7 ± 17,3
2	736,4 ± 56,1	736,4 ± 56,1
3	761,0 ± 89,4	800,4 ± 1,5
4	810,1 ± 6,4	804,6 ± 2,2
5	867,4 ± 4,4	857,0 ± 10,2
6	859,2 ± 5,4	850,0 ± 1,4
7	853,6 ± 3,6	851,6 ± 0,9
8	862,4 ± 15,8	860,8 ± 19,7

MO: Obesos/treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

Para manutenção da corrida dos animais durante o treinamento, a esteira utilizada dispõe de sistema de estímulo elétrico de baixa intensidade (até 3 mA) no final de cada baia.

Os protocolos de treinamento foram planejados e baseados no estudo realizado por Haram et al. (2009) (56).

5.6 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada 96 h após o término do protocolo de treinamento físico. Os animais foram eutanasiados no período matutino (entre 9 h e 12 h) por meio de anestesia com o fármaco isoflurano (Forane, Abbott, Brasil). Em seguida, os animais foram decapitados utilizando guilhotina comercial específica para camundongos adultos (Kent Scientific Corporation, USA), seguindo-se protocolos padronizados e aprovados para este procedimento.

Os animais foram eutanasiados ordenadamente, de forma a igualar as condições entre os grupos. Em seguida, o sangue do tronco foi coletado e os tecidos de interesse foram dissecados (Figura 7), pesados e armazenados: TAM (depósito interescapular), TAB subcutâneo (depósito inguinal), TAB visceral (depósito epididimal), TAB visceral (depósito retroperitoneal), músculos sóleo, músculo gastrocnêmio, coração, fígado e testículos.

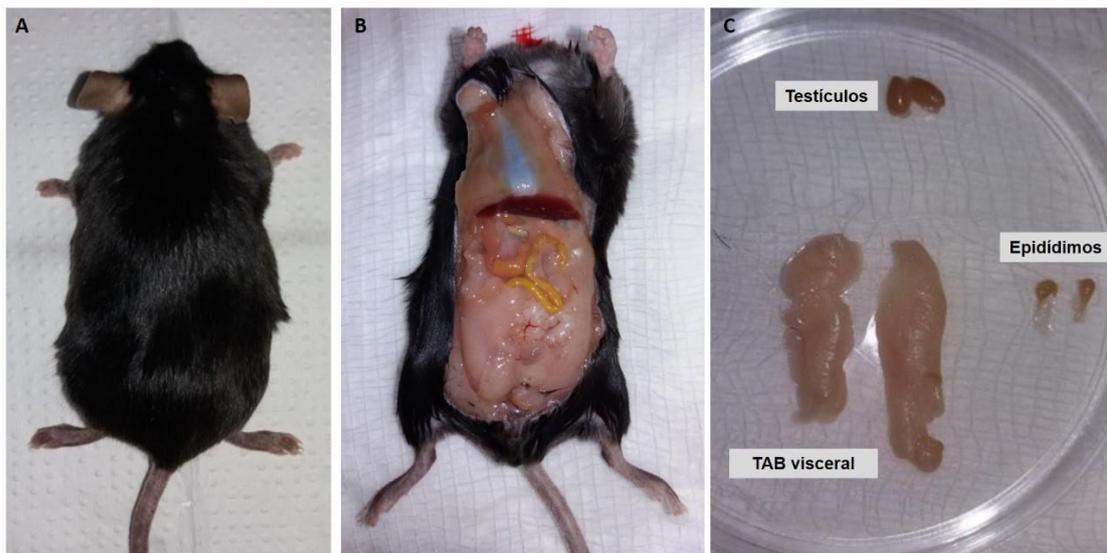


Figura 7. Camundongo com obesidade induzida por dieta hiperlipídica da linhagem C57BL6 antes da eutanásia (A) e após eutanásia (B). Tecido adiposo branco visceral (depósito epididimal), testículos e epidídimos de animal obeso (grupo CH) após eutanásia, sendo preparados para pesagem a ser realizada em balança de alta precisão.

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A TERMOGÊNESE DO TECIDO ADIPOSO

Os tecidos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo armazenados a uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para avaliação da expressão de genes relacionados às vias moleculares relacionadas à termogênese do TAM (depósito interescapular) e do TAB subcutâneo (depósito inguinal).

O método de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi utilizado para a determinação do perfil de expressão de mRNA dos genes UCP1, Cidea, Prdm-16, Pgc1 α , Tmem26, Cd40, LEP e ADIPOQ utilizando kit comercial SYBR GREEN (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA total do tecido foi extraído após uma amostra dos TAB (epididimal e inguinal) e TAM (interescapular) de cada animal ter sido coletada e homogeneizada em tubos cônicos de 15 mL. Foi utilizado o equipamento triturador Ultra-Turrax (IKA Works, Inc., EUA) sob o gelo, adicionando o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, EUA) na proporção de 0,1 g de tecido por mL de Trizol.

Uma vez que aproximadamente 250 mg de tecido foi homogeneizado, o material foi incubado a uma temperatura ambiente, durante 5 min. A amostra foi então transferida para tubos eppendorf estéreis (1,5 mL) e centrifugada a 14000 rpm, por 10 min, a 4 °C.

O material sobrenadante foi coletado e foi adicionado clorofórmio (1:5) seguido da precipitação de RNA, usando 500 µL de isopropanol absoluto (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização).

O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm, durante 5 min, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapurificada. As amostras foram mantidas a -80 °C até sua utilização.

A mensuração da concentração de RNA total obtido em cada amostra foi realizada em espectrofotômetro (Nano-Vue Plus®), por meio de leitura na faixa de absorvância de luz a 260 - 280 nm. A concentração média de RNA encontrado em cada amostra foi de 241 ± 143 ng/µl e a pureza de $1,9 \pm 0,1$ (razão 260/280).

Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicata em uma placa de 96 poços, preparadas com amostra do RNA diluída em água (RNase free). As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A quantificação relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta Ct$, com normalização para o gene de referência que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para isso, os valores de Ct obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do Ct obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intervenção}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$.

Os resultados encontrados foram apresentados em três condições para comparação entre os grupos. Uma comparação considerou o grupo de animais com obesidade induzida por dieta e sem treinamento físico (CH) como calibrador em comparação aos grupos MO e IN, também com obesidade induzida por dieta, porém treinados. Adicionalmente, foram apresentadas comparações considerando o grupo com dieta controle normocalórica, não treinado (CC) em comparação aos grupos CH, MO e IN.

5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK

As proteínas totais dos tecidos do músculo gastrocnêmio e sóleo foram extraídas e utilizadas em ensaios de *Western-Blotting* para quantificação indireta, utilizando anticorpos específicos para a proteína AMPK (AMPK-total), assim como para a avaliação da sua atividade (AMPK α -fosforilada^{Thr172}).

Para extração da proteína, foram utilizados aproximadamente 50 mg de amostra dos músculos gastrocnêmio e sóleo de cada animal, os quais haviam sido coletados e estavam congelados a temperatura de -80 °C. Esses tecidos foram triturados e homogeneizados em um tampão RIPA com inibidores de proteinase e fosfatase por aproximadamente 20 s utilizando um triturador Ultra-Turrax (IKA Works, Inc., EUA) no gelo. Em seguida, o material homogeneizado obtido foi centrifugado a 12000 rpm durante 20 min em uma temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o conteúdo sobrenadante foi coletado e armazenado a temperatura de -80 °C.

A quantidade de proteína em cada amostra foi determinada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro (Thermo Scientific, UK), utilizando o método de *Lowry*.

A partir dos resultados obtidos, a amostra foi desnaturada em um tampão contendo Tris-HCl, glicerol (8%), sulfato de sódio (10%), 2- β -mercaptoetanol (0,4%) e bromofenol (0,05%). O conjugado obtido continha um volume total igual em cada amostra e foi aquecido em água a uma temperatura de 100 °C, durante 5 min.

Em seguida, 25 μ g de cada amostra foi despejado em cada poço do gel separador de poliacrilamida para corrida de separação do peso molecular por

eletroforese utilizando 100 V por 2 h (SDS-PAGE). Os géis foram transferidos (transferência úmida) para uma membrana de PVDF utilizando 100 V por 2 h. As membranas foram então bloqueadas (leite desnatado 5%) por mais 2 h à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com TBS-T (3 x 5 min) antes de serem incubadas por 12 h (*overnight*) com os anticorpos primários anti-fosfoThr172 (número 2531) ou anti AMPK-total (número 2532) (Abcam, EUA).

Em seguida, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T (3 x 5 min) e então incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit (Bio-Rad, UK) durante 1 h a temperatura ambiente. Depois da lavagem (6 x 5 min), foi adicionado um tampão para reação de quimiluminescência (SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

Ao final, as imagens foram obtidas utilizando o equipamento fotodocumentador (Amersham Imager 600 - GE Healthcare Life Sciences, EUA). A partir das imagens, as densidades das bandas foram quantificadas indiretamente utilizando o software *Image J*. Os valores da proteína AMPK-fosforilada e da proteína AMPK-total foram apresentados, assim como o seu valor normalizado (AMPK-fosforilada/AMPK-total).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva e inferencial das variáveis quantitativas contínuas entre os diferentes grupos experimentais. Todos os valores das variáveis do estudo foram expressos como média e erro-padrão da média. A análise da distribuição da amostra foi realizada utilizando o teste estatístico de Shapiro-Wilk, que definiu a utilização dos testes estatísticos apropriados para cada caso.

Na estatística inferencial de dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância de um fator (one way- ANOVA) seguida do pós-teste de Tuckey para a comparação entre as médias de todos os grupos experimentais, para as seguintes variáveis: da análise fenotípica (consumo de água e dieta, peso) e massas dos tecidos coletados após eutanásia. Para efeitos de análise, os valores absolutos das massas dos tecidos coletados foram corrigidos para o peso total do animal, com valores finais apresentados em mg/g de tecido. O teste “t” de student foi utilizado para comparar as variáveis do treinamento (distância média percorrida por dia pelos dois grupos submetidos ao treinamento na esteira).

Na estatística inferencial de dados não-paramétricos foi utilizada a análise de variância de *Kruskal-Wallis*, seguida do pós-teste de *Dunn*, para a comparação da média entre os grupos para a expressão de genes termogênicos do TAM e TAB, assim como para a expressão da proteína AMPK-total e AMPK-fosforilada nos músculos gastrocnêmio e sóleo.

Para análise das correlações entre a massa dos tecidos, a expressão de *Ucp-1* no TAB subcutâneo e a aptidão física, foi utilizado o teste de *Spearman*. As correlações foram avaliadas considerando todos os animais do estudo (n=20) visando gerar maior heterogeneidade de cada variável dentro de cada correlação investigada, sendo assim, fator necessário para a análise de correlação.

A análise das diferenças entre as comparações instituídas foi considerada estatisticamente significativa quando as probabilidades bicaudais das suas ocorrências devidas ao acaso foram menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,05$). Foi considerada tendência estatística quando as probabilidades das suas ocorrências devidas ao acaso foram menores que 10% e maiores que 5% ($p < 0,10$).

Os dados foram analisados utilizando software estatístico *GraphPad Prism 7* (Software, EUA) e *SPSS Statistical Package of Social Sciences* (Software, EUA).

5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos realizados durante o estudo estão de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) (Concea 2013). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, com Unb-Doc número 33236/2015 (ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL)

Os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes sugeridas pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais (CFMV - 2013) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - 2013) que preconizam o uso de métodos (químico e físico) capazes de induzir a perda de consciência e a morte sem estresse dos animais (anestesia seguida por decapitação). Este método de eutanásia é considerado aceitável para roedores de pequeno porte (CONCEA - Resolução Normativa, Nº 13, 2013). Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram

descartadas siguiendo as normas para este tipo de resíduo, Lei Nacional de Resíduos Sólidos N° 12.305/2010.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE FENOTÍPICA ANTES DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Foram calculados os consumos médios de água e dieta dos animais, comparativamente entre cada um dos grupos (CC, n=5; CH, n=5; MO, n=5; e IN, n=5) antes do protocolo de treinamento físico.

6.1.1 Consumo de Água

Os grupos que receberam dieta hiperlipídica (CH, MO e IN) ($14,3 \pm 3,0$ mL) consumiram menos água ($-3,1$ mL/dia, $-3,2$ mL/dia e $-3,1$ mL/dia, respetivamente) em comparação com o grupo controle (CC). Os grupos CH, MO e IN consumiram quantidades médias de água estatisticamente semelhantes.

6.1.2. Consumo de Dieta

Com relação a energia proveniente da dieta, dois grupos que consumiram dieta hiperlipídica (MO e IN) consumiram mais energia proveniente da dieta ($+39$ kJ/dia, $+45$ kJ/dia, respectivamente) em comparação ao grupo controle (CC). No entanto os grupos CC e CH consumiram estatisticamente a mesma quantidade de dieta. Os três grupos que consumiram dieta hiperlipídica (CH, MO, IN) consumiram, comparativamente, a mesma quantidade de energia proveniente da dieta (kJ/dia).

Esta diferença no consumo energético entre os grupos já era esperada, pois, a dieta hiperlipídica é constituída de uma maior quantidade de energia por grama ($22,38$ kJ/dia) em comparação com a dieta controle ($16,74$ kJ/dia). Dados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Consumo médio de água e dieta antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.

	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Água (ml/dia)	$14,3 \pm 3,0$	$11,2 \pm 2,7$	$11,1 \pm 2,4$	$11,2 \pm 2,3$	$p \leq 0,001$	CH,MO,IN<CC
Dieta (kJ/dia)	$190,0 \pm 36,5$	$210,9 \pm 41,4$	$229,0 \pm 42,9$	$235,6 \pm 45,6$	$p \leq 0,01$	MO,IN>CC

* Tuckey ($p \leq 0,05$)

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado
Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

6.1.3 Peso Dos Animais

Os grupos (CC, CH, MO e IN) iniciaram suas respectivas dietas (peso inicial) com pesos estatisticamente semelhantes.

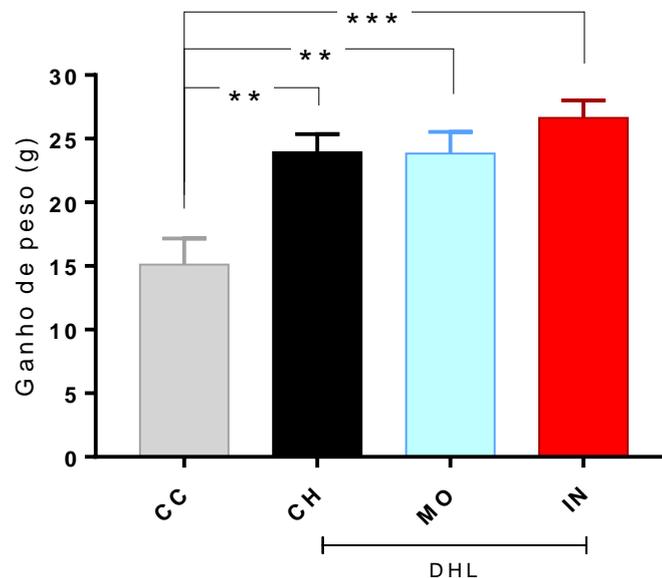
Após 20 semanas de dieta, os grupos que receberam dieta hiperlipídica (CH, MO e IN) apresentaram o peso (peso final) maior (+7,6 g, +9,1 g e +12,1 g, respectivamente) do que o grupo que recebeu dieta controle (CC). Assim, todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica (CH, MO e IN) tiveram uma diferença de peso maior, comparativamente ao grupo que recebeu dieta controle (CC). Dados demonstrados na Tabela 3 e Figura 8.

Tabela 3. Variação do peso dos animais antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.

	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Peso Inicial (g)	12,1 \pm 2,7	11,0 \pm 2,1	12,5 \pm 4,9	12,8 \pm 3,4	p=0,844	
Peso Final (g)	27,3 \pm 3,5	34,9 \pm 4,0	36,4 \pm 5,9	39,4 \pm 3,7	p \leq 0,01	CH [#] ,MO,IN>CC
Diferença de peso (g)	15,1 \pm 4,6	23,9 \pm 3,2	23,8 \pm 3,8	26,6 \pm 3,1	p \leq 0,001	CH,MO,IN>CC

* Tuckey (p \leq 0,05) # Tuckey (p \leq 0,10)

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado



CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade. DHL: dieta hiperlipídica.

* (p \leq 0,05), ** (p \leq 0,01), *** (p \leq 0,001).

Figura 8. Ganho de peso entre grupos, antes do protocolo de treinamento físico. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DURANTE O PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.

Após 20 semanas de dieta, os animais que receberam dieta hiperlipídica (DHL, n=15) foram divididos em três grupos de animais obesos (CH, MO e IN), formando assim os grupos do protocolo de treinamento físico (CC: n=5, CH: n=5, MO: n=5 e IN: n=5). Durante o período de treinamento físico, foram calculados os consumos médios de água e dieta dos animais, comparativamente entre os grupos.

6.2.1 Consumo De Água

Durante o protocolo de treinamento físico, os dois grupos de animais obesos submetidos aos dois protocolos de treinamento (MO e IN) e o grupo controle (CC) consumiram significativamente mais água (+4,5 mL/dia, +3,9 mL/dia e +3,2 mL/dia, respectivamente), em comparação com o grupo controle-obesos (CH). Os grupos CC, MO e IN consumiram quantidades de água estatisticamente semelhantes, comparativamente entre eles. Dados apresentados na Tabela 4.

6.2.2 Consumo de Dieta

Durante o protocolo de treinamento físico, os dois grupos de animais obesos submetidos aos dois protocolos de treinamento (MO e IN) e o grupo controle (CC) consumiram quantidades semelhantes de dieta por dia. Já o grupo controle-obesos (CH) consumiu menos 2,0 g/dia de dieta em relação ao controle (CC).

Os dois grupos submetidos ao treinamento (MO e IN) consumiram mais energia da dieta (+52 KJ/dia e +60,4 KJ/dia, respectivamente) do que o grupo controle (CC), mas a mesma energia proveniente da dieta do que o grupo controle-obesos (CH). Dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Consumo de água e dieta durante o período de treinamentos físicos. Dados apresentados como média \pm EPM.

	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Água (ml/dia)	18,0 \pm 0,9	13,5 \pm 0,9	17,4 \pm 0,9	16,7 \pm 1,0	p<0,01	CC,MO,IN>CH
Dieta (g/dia)	13,8 \pm 0,6	11,8 \pm 0,4	12,6 \pm 0,6	13,0 \pm 0,5	p=0,09	CH [#] <CC
Dieta (kJ/dia)	230,8 \pm 10,1	263,4 \pm 9,8	282,8 \pm 13,7	291,2 \pm 11,85	p<0,01	MO,IN>CC

*(p \leq 0,05) #(p \leq 0,10), post hoc.

CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade.

6.2.3 Peso

Imediatamente antes de iniciar o período de intervenção com treinamentos físicos (peso inicial), todos os grupos de animais obesos (CH, MO e IN) apresentaram uma média de peso significativamente maior (+7,6 g, +9,1 g e +12,1 g, respectivamente) do que o grupo controle (CC).

Imediatamente após o término do protocolo de treinamento físico (peso final), o peso dos animais foi semelhante entre todos os grupos. Adicionalmente, ambos os grupos submetidos ao treinamento (MO e IN) tiveram uma tendência em ganhar menos peso (-2,8 g e -2,6 g, respectivamente) do que o grupo controle (CC). Interessantemente, o ganho de peso entre os dois grupos controle (CH e CC), durante o protocolo de treinamento físico foi estatisticamente semelhante, assim como o ganho de peso entre grupos que fizeram exercício (MO e IN). Somente o grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade moderada (MO) teve uma tendência em ganhar menos peso (-2,6 g) que o grupo controle-obesos (CH). Portanto, embora todos os grupos tenham ganhado peso, os dois grupos que realizaram treinamento em diferentes intensidades (MO e IN), ganharam menos peso do que o grupo controle (CC). Dados de acordo com a Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5. Variação do peso dos animais durante o período de treinamentos físicos. Dados apresentados como média \pm EPM.

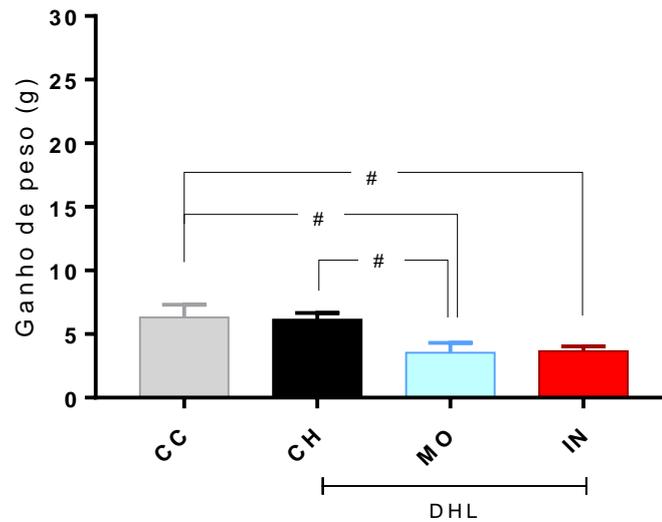
	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Peso Inicial (g) ¹	27,3 \pm 3,5	34,9 \pm 4,0	36,4 \pm 5,9	39,4 \pm 3,7	p<0,01	CH [#] ,MO,IN>CC
Peso Final (g) ²	33,6 \pm 5,0	41,0 \pm 4,1	39,9 \pm 6,6	43,0 \pm 4,3	p \leq 0,05	
Ganho de peso (g)	6,3 \pm 2,2	6,1 \pm 1,2	3,5 \pm 1,7	3,7 \pm 0,9	p \leq 0,05	MO,IN<CC; MO<CH

*(p \leq 0,05) [#](p \leq 0,10), post hoc., *post hoc*

CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

¹ peso no início do período de treinamentos físicos, isto é, após 20 semanas de dieta normolipídica (CC) ou hiperlipídica (CH, MO, IN)

² peso final, após 8 semanas do período de treinamentos físicos.



CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade. DHL: dieta hiperlipídica.

* (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), # (p<0,10),

Figura 9. Ganho de peso ao final do protocolo de treinamento físico, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média ± EPM.

6.3 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO

O grupo que realizou treinamento intervalado de alta intensidade (IN) percorreu uma distância diária de treinamento semelhante ao grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade moderada (MO). Porém, o grupo IN realizou o treinamento em um tempo significativamente menor (-8,6 min/dia) em comparação ao grupo MO.

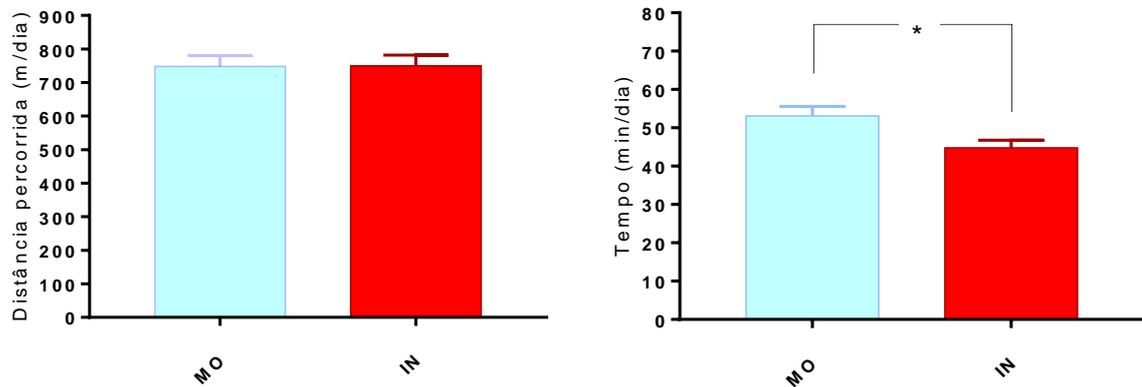
Dados de acordo com a Tabela 6 e Figura 10.

Tabela 6. Comparação do tempo e da distância percorrida entre os protocolos de treinamento. Dados apresentados como média ± EPM.

	MO	IN	Teste "t"
Distância (m/dia)	748,4 ± 204,4	749,7 ± 201,4	p=0,97
Tempo (min/dia)	53,4 ± 15,4*	44,8 ± 12,8	p≤0,05

MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

*MO>IN.



MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade.

* ($p \leq 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), # ($p < 0,10$).

Figura 10. Distância percorrida e tempo dispendido diariamente entre os grupos MO e IN, durante os protocolos de treinamento. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.4. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO TREINAMENTO

6.4.1 Distância Percorrida

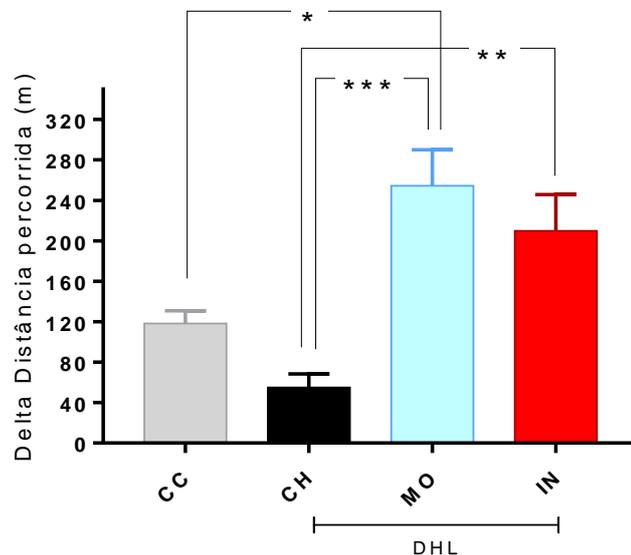
Antes do início do protocolo de treinamento físico, a distância percorrida (distância inicial) no teste de esteira por todos os grupos de animais obesos (CH, MO e IN) foi menor (-45,2m, -50,2 m e -48,2 m, respectivamente) do que o grupo controle (CC).

Após o protocolo de treinamento físico, a distância percorrida (distância final) no teste de esteira pelos dois grupos que realizaram treinamento (MO e IN) e o grupo controle (CC) foram significativamente maiores (+194,8 m, +152,0 m e +108,5 m, respectivamente) em comparação somente com o grupo controle-obesos (CH). Adicionalmente, não houve diferença na distância final percorrida entre os protocolos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles.

Portanto, a diferença da distância percorrida antes e após os protocolos experimentais (distância delta) foi significativamente maior (+199,8 m e +155,0 m, respectivamente) nos dois grupos de treinamento (MO e IN) em comparação com o controle-obesos (CH). Somente o grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade moderada (MO) teve um aumento na distância percorrida no teste em comparação ao grupo controle (CC). Ambos os grupos que realizaram os protocolos

de treinamento com diferentes intensidades (IN e MO) tiveram aumentos semelhantes na distância percorrida, comparativamente entre eles.

Dados de acordo com a Tabela 7 e Figura 11.



CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade.

* ($p \leq 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), # ($p < 0,10$)

Figura 11. Diferença da distância percorrida no teste de esteira entre os grupos submetidos aos protocolos de treinamento. Dados apresentados como média \pm EPM.

Tabela 7. Distância percorrida no teste de esteira. Dados apresentados como média \pm EPM.

	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Distância Inicial (m)	238,2 \pm 14,1	193,0 \pm 17,5	188,0 \pm 29,5	190,0 \pm 33,6	$p \leq 0,05$	CH,MO,IN < CC
Distância Final (m)	356,4 \pm 26,0	247,8 \pm 42,1	442,6 \pm 86,7	399,8 \pm 73,3	$p < 0,001$	CC,MO,IN > CH
Distância Delta (m)	118,2 \pm 28,5	54,8 \pm 30,8	254,6 \pm 79,2	209,8 \pm 80,2	$p < 0,001$	MO > CC; MO,IN > CH

*($p \leq 0,05$)

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Obesos/Sem intervenção IF: Obesos/Inatividade Física MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

6.5 ANÁLISE DESCRITIVA E INFERENCIAL DOS TECIDOS COLETADOS PÓS EUTANÁSIA

Após o término do protocolo de treinamento físico, os animais foram eutanasiados e os tecidos de interesse foram coletados e devidamente pesados, para caracterização da amostra e comparação entre os grupos. Os dados estão

apresentados como massa do tecido relativa ao peso do animal na Tabela 8. As representações gráficas desses dados encontram-se na Figura 12.

6.5.1 Tecido Adiposo Marrom

A massa do TAM (depósito interescapular) do grupo submetido ao protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (IN) foi significativamente maior (+3,7 mg/g) do que o grupo controle (CC). No entanto, não houve diferença na massa do TAM (depósito interescapular), comparativamente entre os grupos de treinamento (MO e IN).

Dados de acordo com a Figura 12A e Tabela 8.

6.5.2 Tecido Adiposo Subcutâneo

As massas do TAB subcutâneo (depósito inguinal) dos três grupos de animais obesos (CH, MO e IN) foram significativamente maiores (+23,0 mg/g, +15,8 mg/g e +20,6 mg/g, respectivamente) do que o grupo controle (CC). Entretanto, não houve diferença entre os grupos de treinamento para a massa do TAB subcutâneo, (depósito inguinal), comparativamente entre os grupos (MO e IN).

Dados de acordo com a Figura 12B e Tabela 8.

6.5.3 Músculo Gastrocnêmio

As massas do músculo gastrocnêmio dos grupos CH e MO foram significativamente menores (-5,6 mg/g e -5,8 mg/g, respectivamente) do que no grupo controle com dieta controle (CC). No entanto, a massa do músculo gastrocnêmio do grupo IN não foi diferente em relação ao controle (CC).

Dados de acordo com a Figura 12E e Tabela 8.

6.5.4 Coração

A massa do coração foi estatisticamente diferente entre os dois grupos controles (CH e CC). A massa do coração do grupo controle-obesos (CH), portanto, foi significativamente menor (-0,8 mg/g) do que a do controle (CC). Por outro lado, a massa do coração do grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade

moderada (MO) foi maior (+0,9 mg/g) do que a do grupo controle-obesos (CH). Adicionalmente, não houve diferença entre os grupos de treinamento.

Dados de acordo com a Figura 12H e Tabela 8.

6.5.5 Testículos

As massas dos testículos do grupo controle-obesos (CH), assim como do grupo de treinamento contínuo de intensidade moderada (MO) foram menores (-1,8 mg/g e -1,4 mg/g, respectivamente) do que a do grupo controle (CC). No entanto, somente o grupo que fez treinamento intervalado de alta intensidade (IN) apresentou massa dos testículos semelhante ao controle (CC). Não houve diferença entre os protocolos de treinamento.

Dados de acordo com a Figura 12G e Tabela 8.

6.5.6 Outros tecidos

A massa dos outros tecidos de interesse, coletados dos animais e devidamente pesados, foi estatisticamente semelhante, comparativamente entre todos os grupos experimentais (CC, CH, MO e IN) para o TAB visceral (depósito epididimal), TAB visceral (depósito retroperitoneal), fígado e músculo sóleo.

Dados de acordo com a Figuras 12 e Tabela 8.

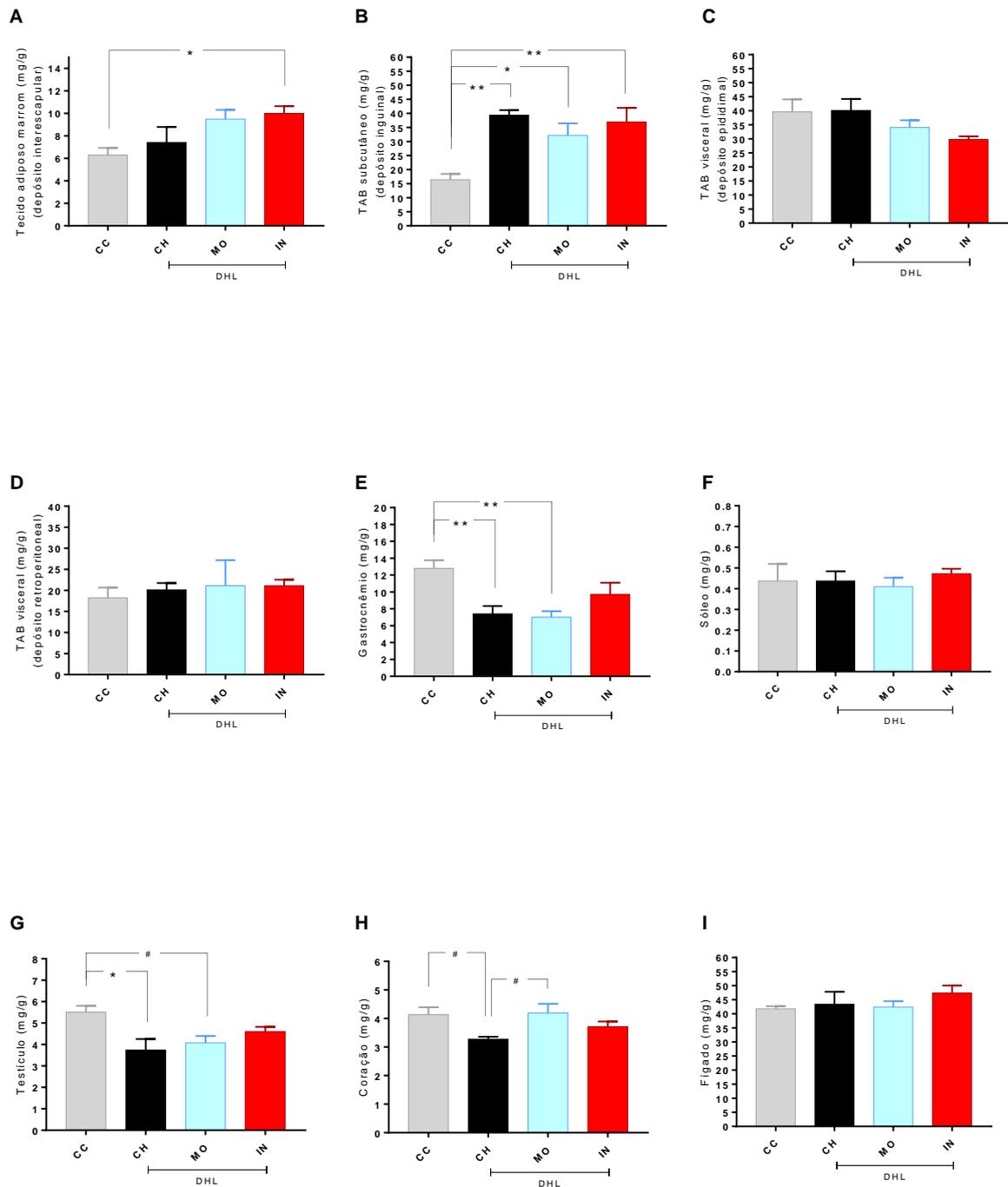


Figura 12. Massa de todos os tecidos de interesse coletados após o final do protocolo de treinamento físico (Tecido Adiposo Marrom (TAM) (A); TAB subcutâneo (B); TAB visceral – depósito epididimal (C); TAB visceral – depósito retroperitoneal (D); Gastrocnêmio (E); Sóleo (F); Testículo (G); Coração (H); Fígado (I)), corrigidas para o peso do animal (mg/g). Dados apresentados como média \pm EPM.

Tabela 8. Massa dos tecidos coletados pós eutanásia. Dados apresentados como média \pm EPM.

Valores relativos (mg/g)	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Tecido adiposo marrom (subclavicular)	6,3 \pm 0,6	7,4 \pm 1,4	9,5 \pm 0,8	10,0 \pm 0,6	p \leq 0,05	IN [#] >CC
Tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal)	16,4 \pm 2,1	39,4 \pm 1,8	32,2 \pm 4,3	37,0 \pm 5,0	p<0,001	CH,MO,IN>CC
Tecido adiposo branco visceral (epididimal)	39,6 \pm 4,5	40,1 \pm 4,1	34,1 \pm 2,5	29,8 \pm 1,1	p=0,130	
Tecido adiposo branco visceral (retroperitoneal)	18,2 \pm 2,5	20,1 \pm 1,6	21,1 \pm 6,1	21,1 \pm 1,5	p=0,925	
Gastrocnêmio	12,8 \pm 1,0	7,4 \pm 0,9	7,0 \pm 0,7	9,7 \pm 1,4	p<0,01	CH,MO<CC
Sóleo	0,4 \pm 0,10	0,4 \pm 0,04	0,4 \pm 0,04	0,5 \pm 0,02	p=0,883	
Testículos	5,5 \pm 0,3	3,7 \pm 0,5	4,1 \pm 0,3	4,6 \pm 0,2	p \leq 0,05	CH,MO [#] <CC
Coração	4,1 \pm 0,3	3,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3	3,7 \pm 0,2	p \leq 0,05	CC,MO>CH
Fígado	41,8 \pm 0,1	43,4 \pm 4,4	42,4 \pm 2,2	47,4 \pm 2,7	p=0,519	

* (p \leq 0,05) [#] (p<0,10)

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Obesos/Sem intervenção IF: Obesos/Inatividade Física MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade. Dados demonstrados como média \pm erro padrão da média.

6.5.7 Correlações

A massa média relativa do músculo gastrocnêmio apresentou correlação positiva moderada ($r=0,561$) significativa ($p\leq 0,05$) com a massa do testículo dos animais de todos os grupos utilizados no estudo ($n=20$). De acordo com a Figura 13.

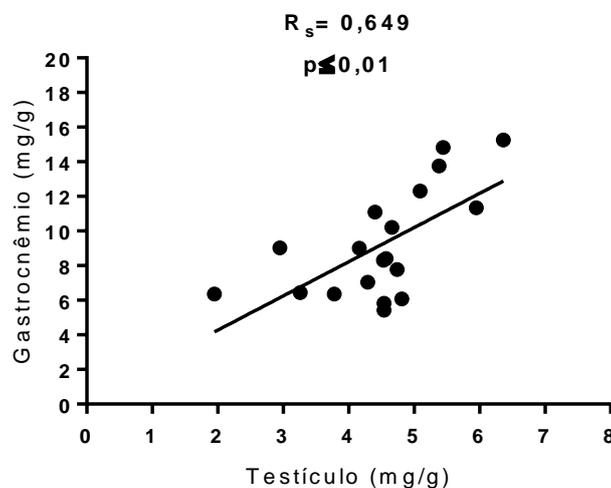


Figura 13. Correlação da massa do músculo gastrocnêmio (mg/g) com a massa do testículo (mg/g) considerando os animais de todos os grupos ($n=20$).

O aumento da capacidade cardiorrespiratória medido pela distância percorrida apresentou uma correlação negativa ($r = -0,645$) com a transcrição de UCP1 no TAM ($p < 0,01$) dos animais de todos os grupos utilizados no estudo ($n = 20$). De acordo com a Figura 14.

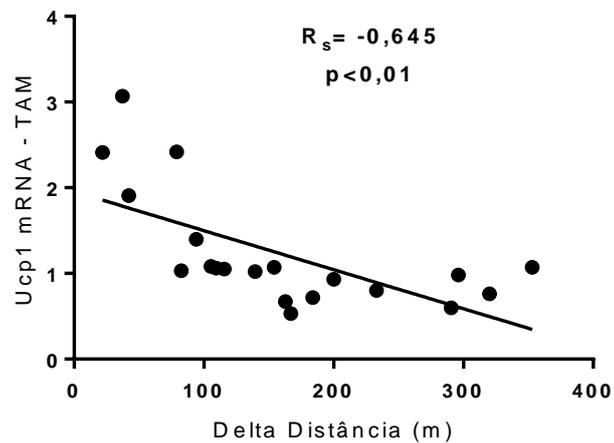


Figura 14. Correlação da transcrição de UCP1 no tecido adiposo marrom com o delta da distância percorrida no teste de rampa (m) considerando os animais de todos os grupos ($n = 20$).

A massa do TAB subcutâneo apresentou uma correlação negativa ($r = -0,764$) com a transcrição de UCP1 no TAB ($p < 0,001$) dos animais de todos os grupos utilizados no estudo ($n = 20$). De acordo com a Figura 15.

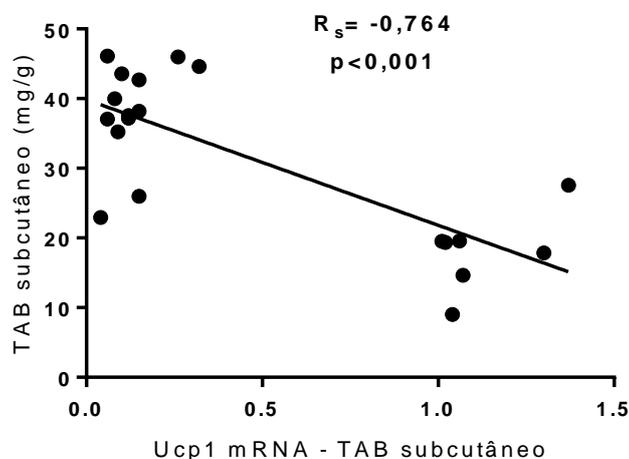


Figura 15. Correlação do tecido adiposo branco subcutâneo (mg/g) com a transcrição de UCP1 no tecido adiposo branco considerando os animais de todos os grupos ($n = 20$).

6.6 ANÁLISE INFERENCIAL DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK NO TECIDO MUSCULAR

A expressão da proteína AMPK foi avaliada nos tecidos dos músculos gastrocnêmio e sóleo. Os valores foram analisados comparativamente entre os grupos e obtidos utilizando a análise semi-quantitativa da expressão da proteína fosforilada (ativada) e da proteína total, assim como o cálculo da sua expressão relativa (fosforilada/total).

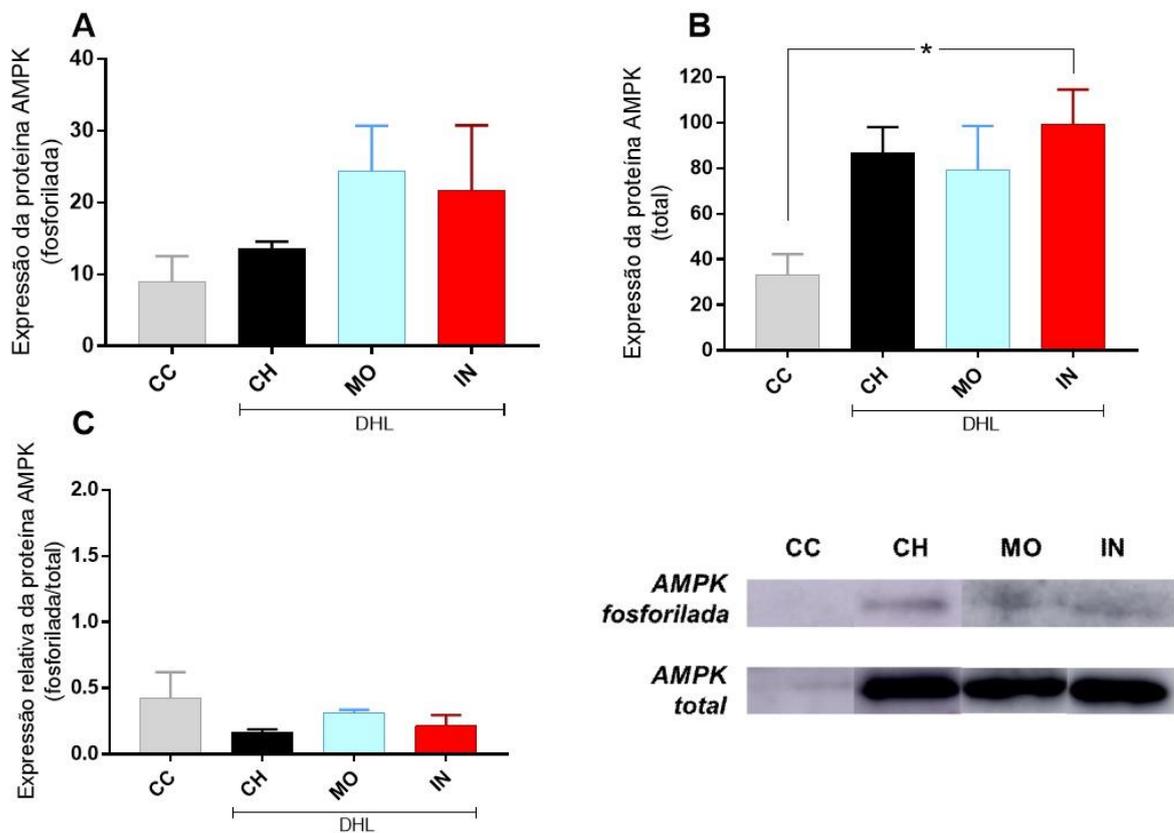
6.6.1 Músculo Gastrocnêmio

Com relação a expressão da proteína AMPK-fosforilada no músculo gastrocnêmio, não houve diferença entre os grupos, independentemente do protocolo de treinamento.

No entanto, a expressão da AMPK-total do grupo que realizou treinamento intervalado de alta intensidade (IN) foi maior (+65,8) do que no grupo controle (CC). Adicionalmente, a expressão da AMPK-total não foi diferente entre os protocolos de treinamento (MO e IN).

No músculo gastrocnêmio, a expressão da proteína AMPK-fosforilada foi calculada relativamente à expressão da proteína-total (AMPK relativa) e não houve diferença entre os grupos estudados (CC, CH, MO e IN)

Dados de acordo com Figura 16 e Tabela 9.



A. Expressão da proteína *AMPK-fosforilada* no músculo gastrocnêmio, entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). **B.** Expressão da proteína *AMPK-total* no músculo gastrocnêmio entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). **C.** Expressão da proteína *AMPK* relativa (*fosforilada/total*) no músculo gastrocnêmio entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$), #($p < 0,10$). Post Hoc de Dunn.

Figura 16. Expressão da proteína AMPK fosforilada (A), total (B) e relação entre fosforilada/total (C) no músculo gastrocnêmio, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média \pm EPM.

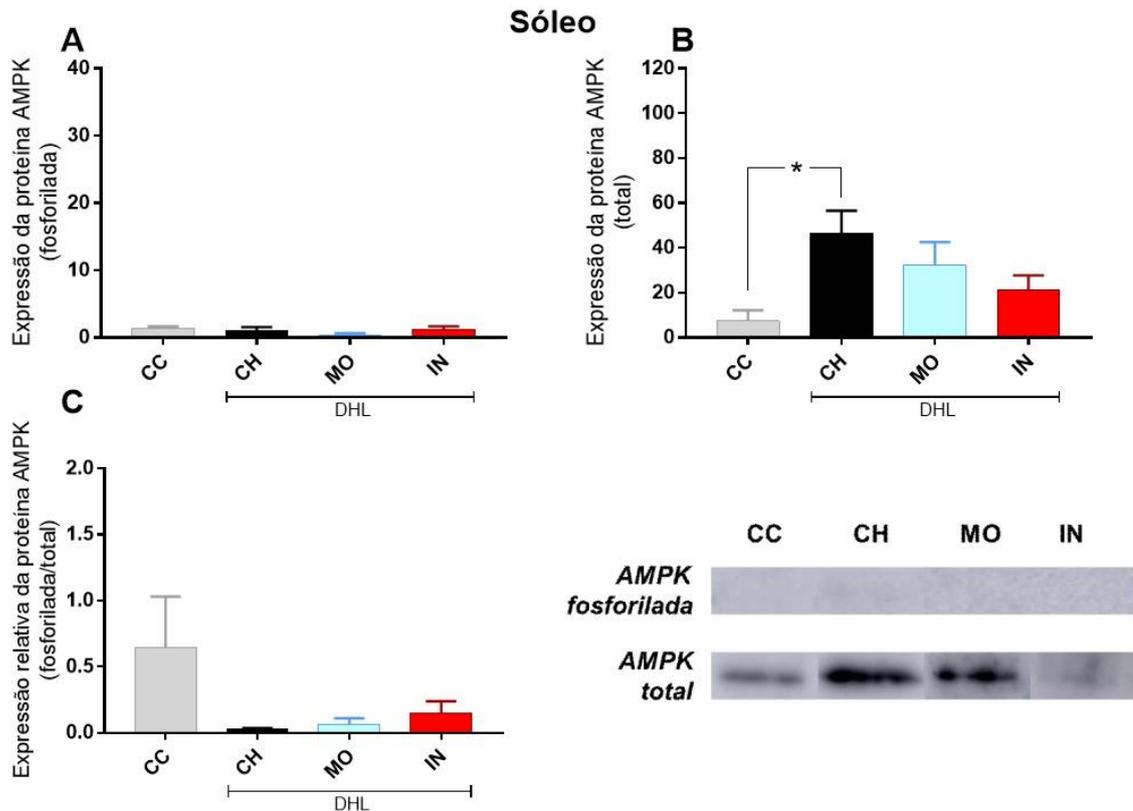
6.6.2 Músculo Sóleo

Assim como no músculo gastrocnêmio, a expressão da proteína AMPK-fosforilada no músculo sóleo não foi estatisticamente diferente, comparativamente entre os grupos experimentais (CC, CH, MO e IN).

Com relação a AMPK-total, o grupo controle-obesos (CH) foi maior (+39,2) do que no grupo controle (CC). Adicionalmente, a expressão da proteína AMPK-total não foi diferente entre os protocolos de treinamento (MO e IN).

No músculo sóleo, a expressão da proteína AMPK fosforilada foi calculada relativamente à expressão da proteína total (AMPK relativa) e não houve diferença entre os grupos estudados (CC, CH, MO e IN)

Dados de acordo com a Figura 17 e Tabela 9.



A. Expressão da proteína AMPK-fosforilada no músculo sóleo, entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). **B.** Expressão da proteína AMPK-total no músculo sóleo entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). **C.** Expressão da proteína AMPK relativa (fosforilada/total) no músculo sóleo entre todos grupos experimentais (CC, CH, MO, IN). CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado. *($p \leq 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$), #($p < 0,10$). Post Hoc de Dunn.

Figura 17. Expressão da proteína AMPK fosforilada (A), total (B) e relação entre fosforilada/total (C) no músculo sóleo, comparativamente entre os grupos. Dados apresentados como média \pm EPM.

Tabela 9. Expressão da proteína AMPK no músculo. Dados apresentados como média \pm EPM.

AMPK	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
Músculo Gastrocnêmio (fosforilada)	9,00 \pm 3,56	13,60 \pm 0,98	24,40 \pm 6,28	21,60 \pm 9,14	$p=0,41$	
Músculo Sóleo (fosforilada)	1,40 \pm 0,25	1,00 \pm 0,55	0,4 \pm 0,25	1,20 \pm 0,49	$p=0,20$	
Músculo Gastrocnêmio (total)	33,40 \pm 8,99	86,80 \pm 11,27	79,00 \pm 19,60	99,20 \pm 15,36	$p \leq 0,05$	IN>CC
Músculo Sóleo (total)	7,40 \pm 4,76	46,60 \pm 9,94	32,20 \pm 10,33	21,40 \pm 6,37	$p \leq 0,05$	CH>CC
Músculo Gastrocnêmio (f/total)	0,42 \pm 0,20	0,17 \pm 0,2	0,31 \pm 0,03	0,21 \pm 0,08	$p=0,30$	
Músculo Sóleo (f/total)	0,65 \pm 0,38	0,03 \pm 0,01	0,06 \pm 0,05	0,15 \pm 0,09	$p=0,33$	

*($p \leq 0,05$)

CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

6.7 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO ADIPOSEO

6.7.1 Análise Da Transcrição Gênica De Genes Termogênicos No Tecido Adiposo Marrom

Para avaliação da expressão de genes termogênicos do tecido adiposo, foi avaliada a expressão do gene UCP1 no TAM (depósito interescapular) (Tabela 10 e 11).

A expressão gênica da UCP1 no TAM foi menor nos dois grupos que realizaram os protocolos de treinamento (MO e IN) (-0,62 e -0,62, respectivamente) em comparação ao grupo controle-obesos (CH), quando considerado o calibrador controle-obesos (CH) (Figura 18A).

Os resultados foram semelhantes mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo controle (CC) (Figura 18B). Não houve diferença entre os dois protocolos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum caso.

A expressão gênica da UCP1 no TAM foi maior (+1,08) no grupo controle-obesos (CH) em comparação ao controle (CC) (Figura 18C).

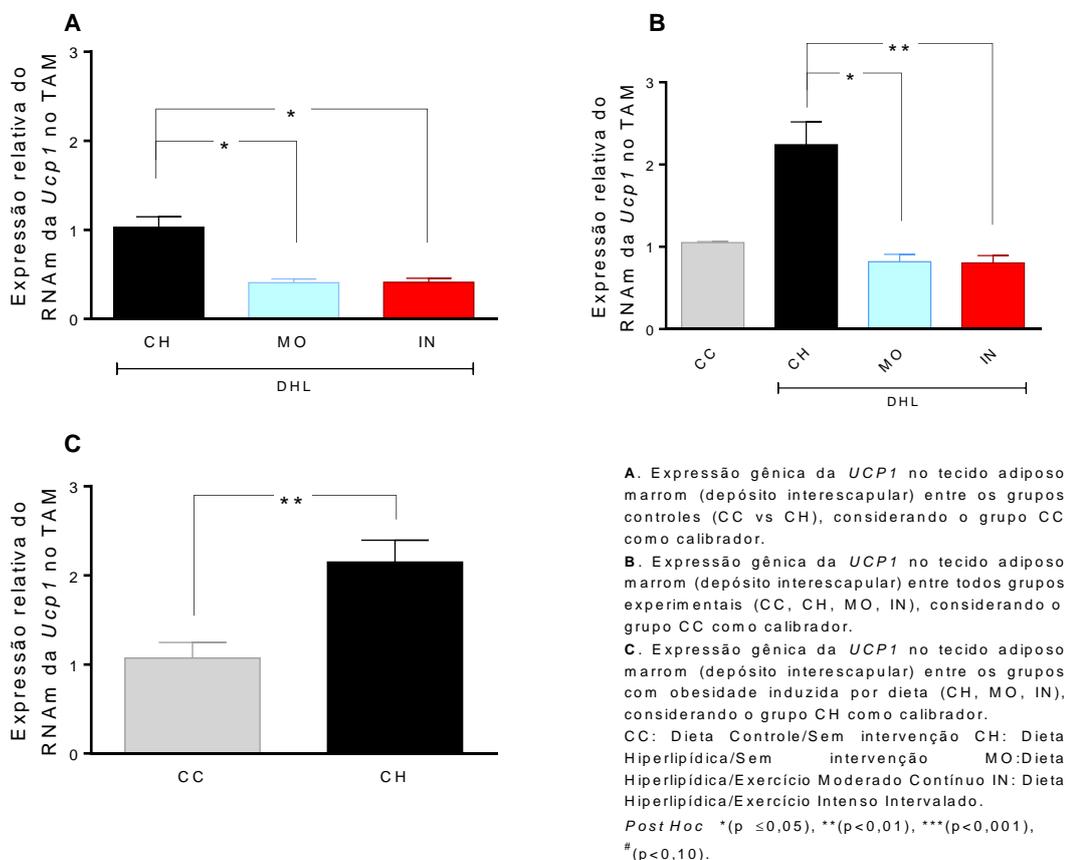


Figura 18. Expressão relativa do RNAm da UCP1 no tecido adiposo marrom. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.7.2 Análise Da Expressão De Genes Termogênicos No Tecido Adiposo Branco

Para avaliação da expressão de genes termogênicos do TAB, foram avaliados os genes UCP1, Cox5b, Cidea, Prdm-16 e Pgc1 α (Tabela 10 e 11).

6.7.2.1 Expressão gênica da UCP1 No Tecido Adiposo Branco Subcutâneo (Depósito Inguinal)

Com relação a expressão da UCP1 no TAB, não houve diferença entre os grupos, comparativamente entre eles (CH, MO e IN), quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 19A).

Os resultados foram semelhantes mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo com dieta controle (CC) (Figura 19B). Adicionalmente, também não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores.

No entanto, a expressão gênica da UCP1 no TAB subcutâneo foi menor (-0,89) no grupo de controle-obesos (CH) em comparação com controle (CC), isoladamente entre eles (Figura 19C).

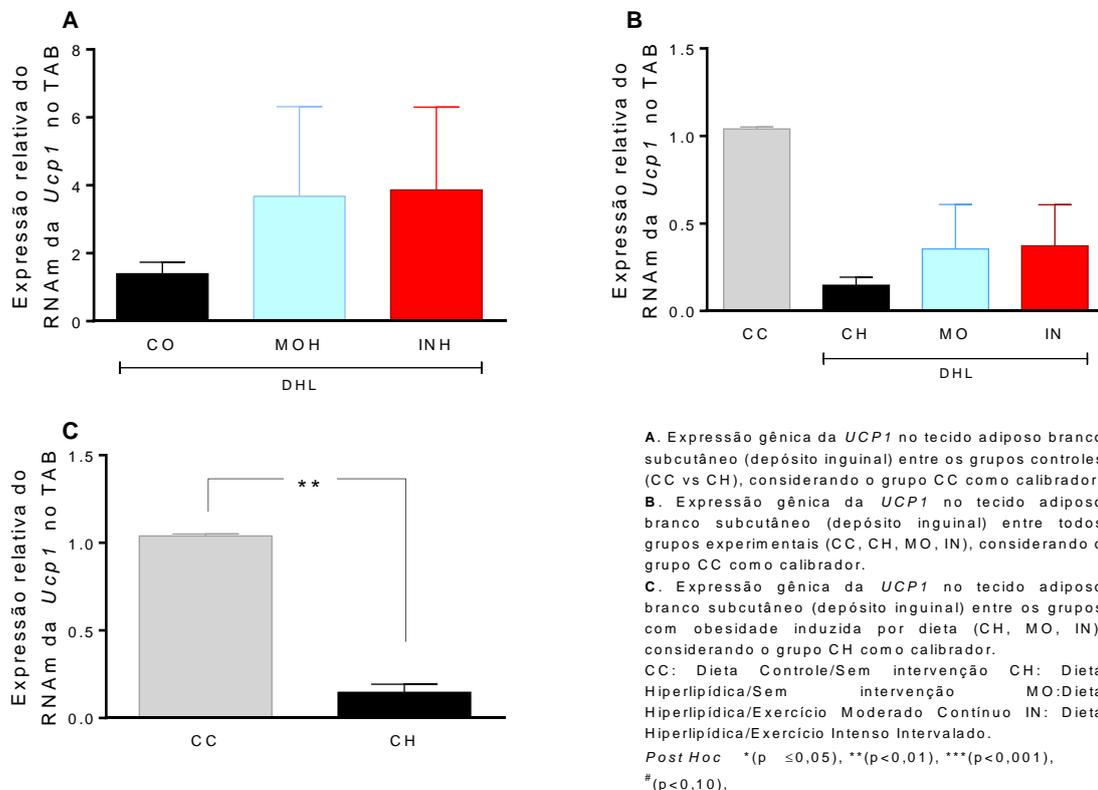


Figura 19. Expressão relativa do RNAm da UCP1 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.7.2.2 Expressão Dos Genes *Cidea*, *Prdm-16* E *Pgc1α* No Tecido Adiposo Branco Subcutâneo (Depósito Inguinal)

Com relação a expressão dos genes termogênicos *Cidea*, *Prdm-16* e *Pgc1α* no TAB, não houve diferença entre os grupos (CH, MO e IN), comparativamente entre eles, quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 20A, 21A e 22A) (Tabela 10 e 11).

Os resultados foram semelhantes mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo controle (CC) (Figura 19B). Também não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores (Figura 20B, 21B e 22B).

Da mesma forma, não houve diferenças significativas na transcrição gênica do *Cidea*, *Prdm-16* e *Pgc1α* no TAB, entre os grupos controles (CC e CH), isoladamente entre eles (Figura 20C, 21C e 22C).

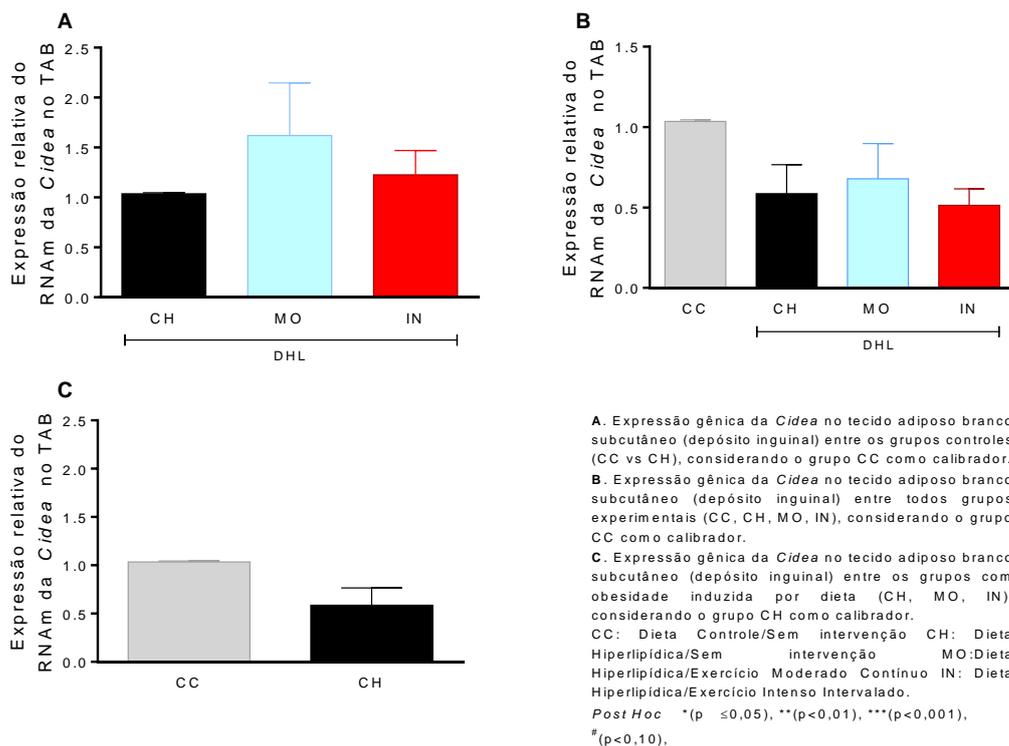


Figura 20. Expressão relativa do RNAm da *Cidea* no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

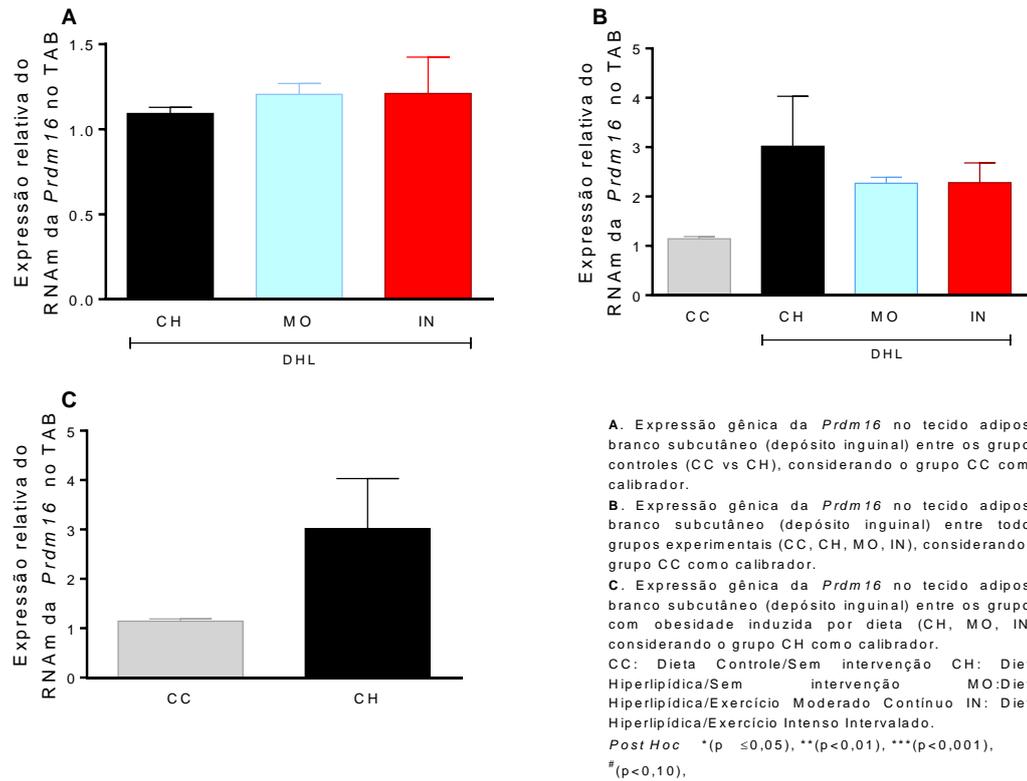


Figura 21. Expressão relativa do RNAm da *Prdm-16* no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

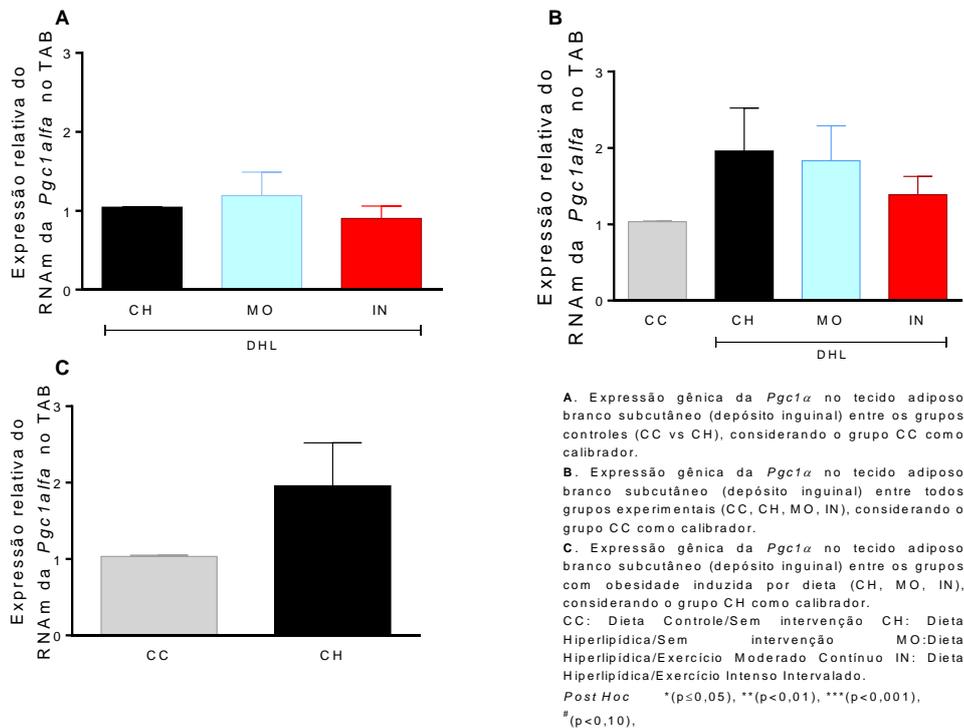


Figura 22. Expressão relativa do RNAm da *Pgc1α* no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.7.2.3 Análise de Gene Marcador de Biogênese Mitocondrial no Tecido Adiposo Branco

Para avaliação da expressão de gene marcador de biogênese mitocondrial do TAB, foi avaliada a expressão gênica da Cox5b no TAB subcutâneo (depósito inguinal) (Tabela 10 e 11).

Com relação a expressão do gene Cox5b no TAB, não houve diferença entre os grupos, comparativamente entre eles (CH, MO e IN), quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 23A).

Os resultados foram semelhantes mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo controle (CC). Adicionalmente, também não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores (Figura 23B).

Da mesma forma, não houve diferenças significativas na expressão gênica de Cox5b no TAB entre os dois grupos controles (CC e CH), isoladamente entre eles (Figura 23C).

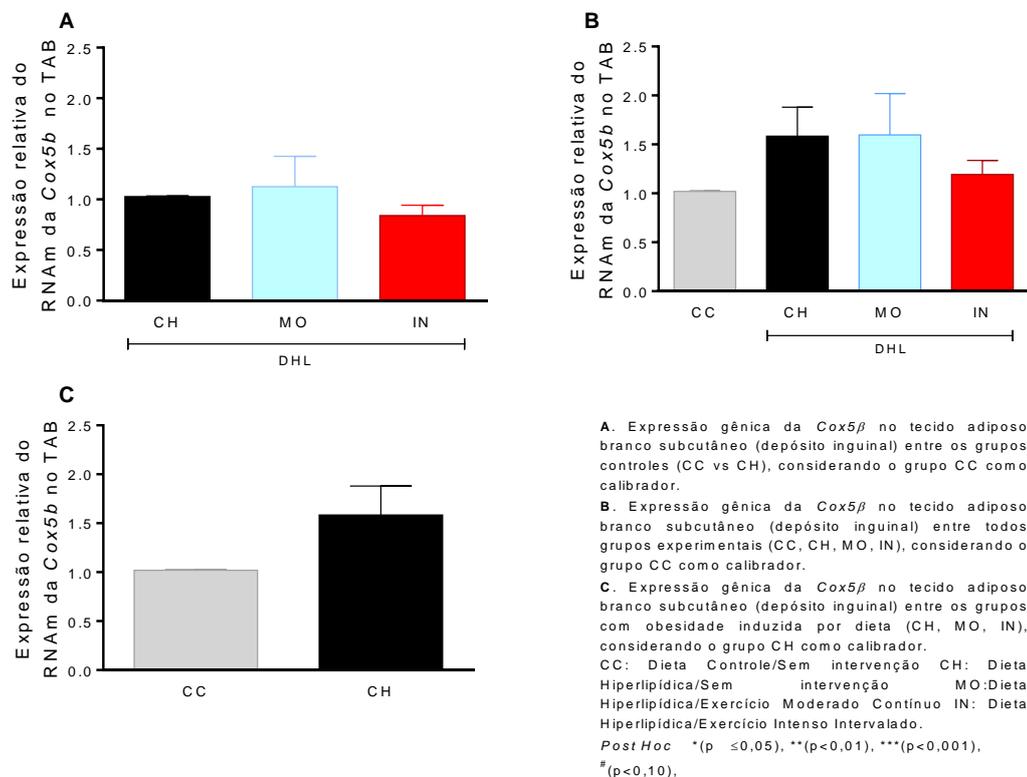


Figura 23. Expressão relativa do RNAm da Cox5b no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

6.7.2.4 Análise Dos Genes Seletivos De Adipócitos Bege No Tecido Adiposo Branco

Para avaliação da expressão de genes seletivos de adipócitos bege no TAB subcutâneo (depósito inguinal), foram avaliados os genes Tmem26 e Cd40 (Tabela 10 e 11).

a) Expressão gênica da Tmem26 no tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal)

Com relação a expressão do gene Tmem26 no TAB, não houve diferença entre os grupos, comparativamente entre eles (CH, MO e IN) quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 24A).

Por outro lado, quando o calibrador considerado foi o grupo controle (CC), o grupo com treinamento intervalado de alta intensidade (IN) apresentou maior expressão (+2,9) do gene seletivo de adipócito bege Tmem26 do que o controle (CC). Adicionalmente, também houve uma tendência do grupo controle hiperlipídica (CH) ser maior (+1,16) que o grupo controle (CC). No entanto, não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores (Figura 24B).

A expressão de Tmem26 no TAB subcutâneo foi maior (+1,16) no grupo controle-obesos (CH) em comparação com grupo controle (CC), isoladamente entre eles (Figura 24C).

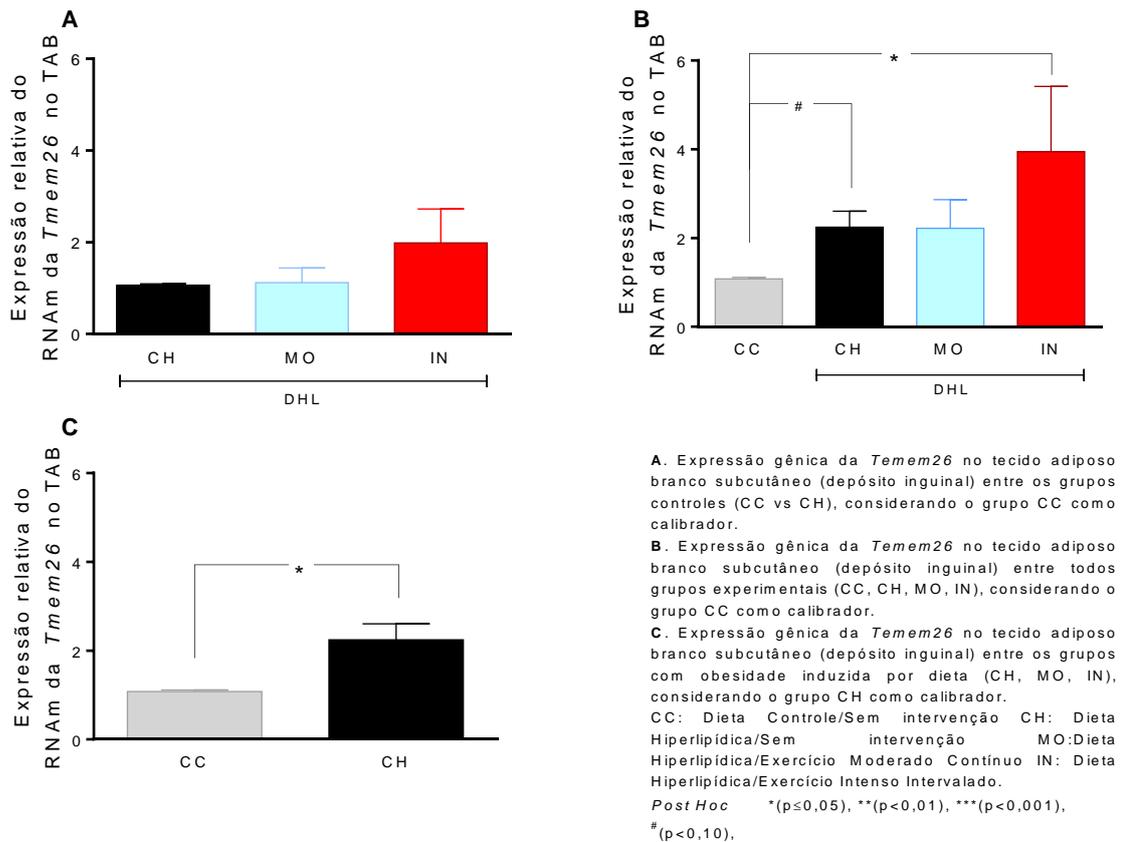


Figura 24. Expressão relativa do RNAm da *Tmem26* no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

b) Expressão gênica da Cd40 no tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal)

Com relação a expressão de Cd40 no TAB, não houve diferenças significativas entre os grupos, comparativamente entre eles (CH, MO e IN), quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 25A).

Da mesma forma, também não houve diferenças significativas entre os grupos mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo com dieta controle (CC) (Figura 25B). Adicionalmente, também não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores.

Não houve diferenças significativas na transcrição gênica do Cd40 no TAB entre os dois grupos controles (CC e CH), isoladamente entre eles (Figura 25C).

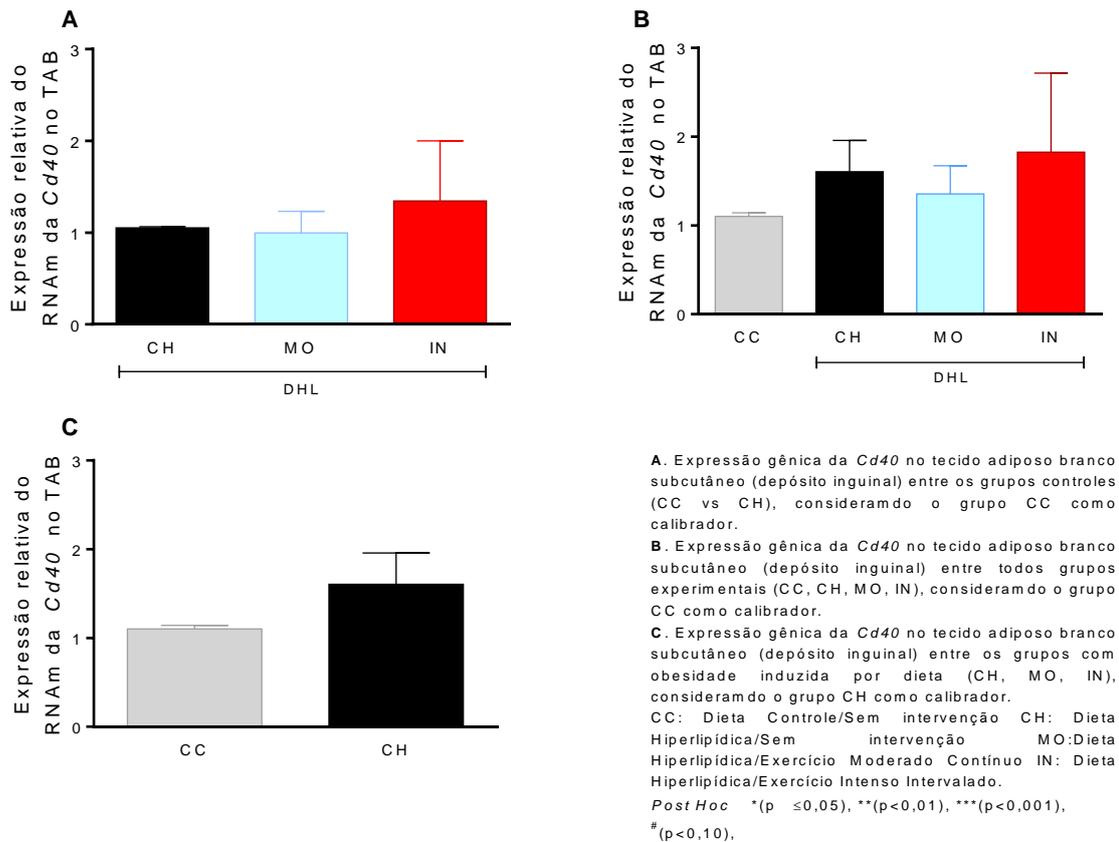


Figura 25. Expressão relativa do RNAm da Cd40 no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média ± EPM.

6.7.2.5 Análise da Expressão de Genes relacionados a hormônios produzidos pelo tecido adiposo

Para avaliação da expressão de genes hormônios produzidos pelo tecido adiposo no TAB subcutâneo (depósito inguinal), foram avaliados os hormônios LEP e ADIPOQ (Tabela 10 e 11).

a) Expressão gênica da LEP no tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal)

A expressão da LEP no TAB foi menor (-0,5) no grupo que realizou treinamento intervalado de alta intensidade (IN), em comparação ao grupo controle-obesos (CH), quando este foi considerado como calibrador (Figura 26A).

Por outro lado, quando o calibrador considerado para análise foi o grupo controle (CC), tanto o grupo com treinamento contínuo de intensidade moderada (MO) quanto o grupo controle-obesos (CH) apresentaram maior (+20,6 e +34,1,

respectivamente) expressão da LEP do que o grupo controle (CC). Adicionalmente, não houve diferença entre os dois grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores (Figura 26B).

A expressão da LEP no TAB foi maior (+0,89) no grupo controle-obesos (CH) em comparação com o grupo controle (CC), isoladamente entre eles (Figura 26C).

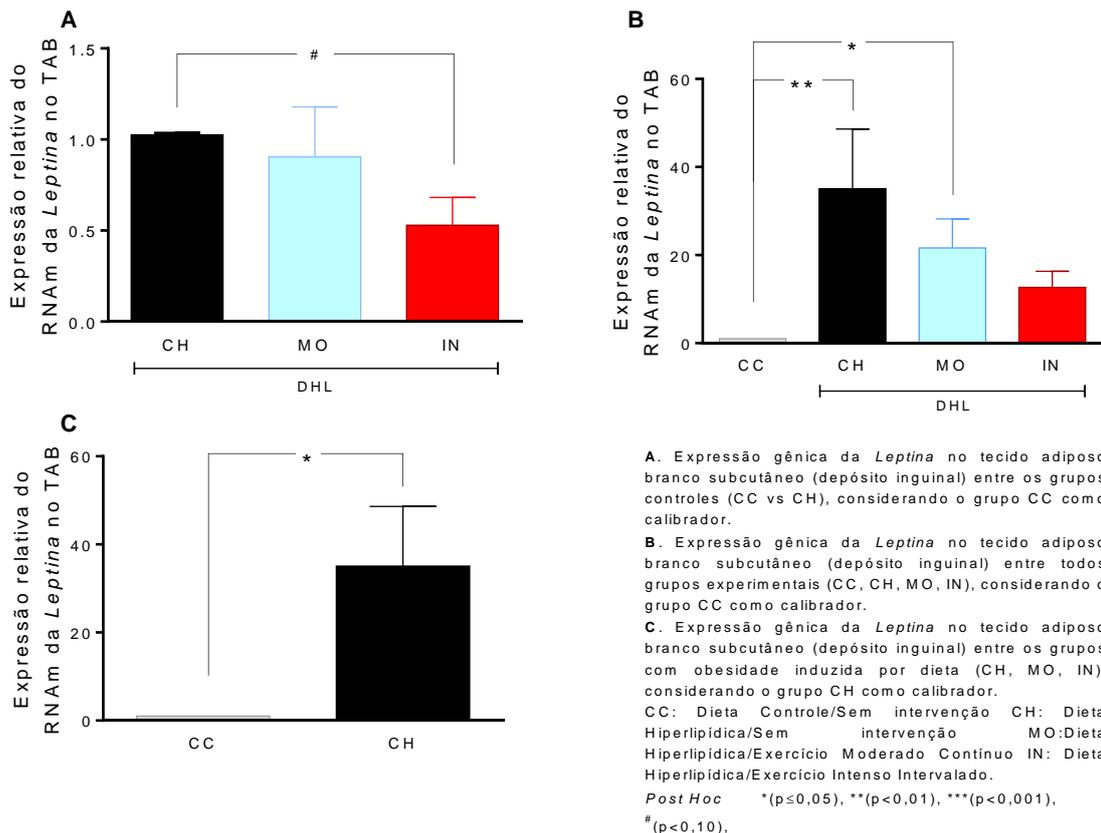


Figura 26. Expressão relativa do RNAm da LEP no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média \pm EPM.

b) Expressão gênica da ADIPOQ no tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal)

Com relação a expressão da ADIPOQ no TAB, não houve diferenças significativas entre os grupos (CH, MO e IN), comparativamente entre eles, quando considerado o grupo controle-obesos (CH) como calibrador (Figura 27A).

Da mesma forma, também não houve diferenças significativas entre os grupos (CH, MO, IN), mesmo quando o calibrador considerado foi o grupo controle (CC) (Figura 27B). Adicionalmente, também não houve diferença entre os dois

grupos de treinamento (MO e IN), comparativamente entre eles, em nenhum dos casos anteriores (Figura 27A).

Além disso, também não houve diferença significativa na expressão da ADIPOQ no TAB entre os grupos controles (CC e CH), isoladamente entre eles (Figura 27C).

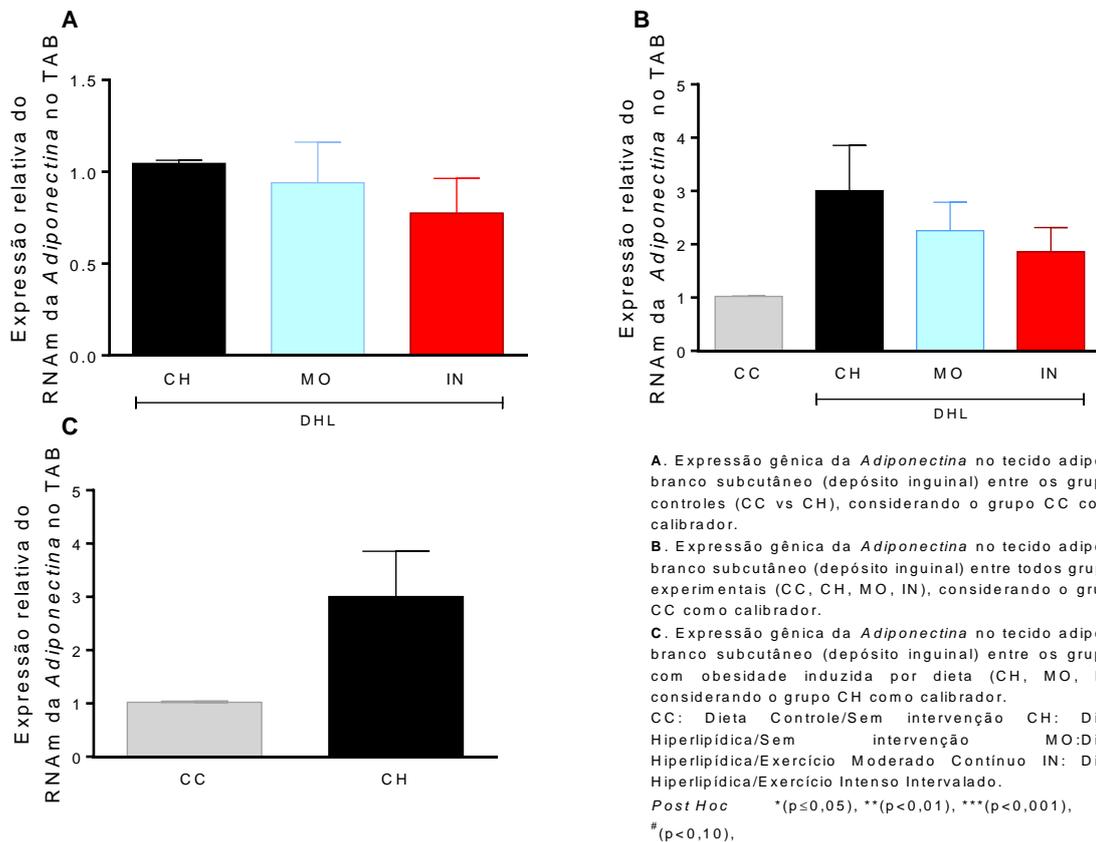


Figura 27. Expressão relativa do RNAm da ADIPOQ no tecido adiposo branco. Dados apresentados como média ± EPM.

Tabela 10. Expressão dos genes relacionados a termogênese no tecido adiposo marrom e branco entre os grupos de animais obesos, considerando o grupo controle-obesos (CH) como calibrador. Dados apresentados como média \pm EPM.

TAM	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
UCP1	1,03 \pm 0,12	0,41 \pm 0,04	0,41 \pm 0,05	p \leq 0,05	MO,IN<CH
TAB					
UCP1	1,40 \pm 0,34	3,67 \pm 2,64	3,86 \pm 2,44	p=0,98	
Cidea	1,04 \pm 0,01	1,62 \pm 0,53	1,23 \pm 0,25	p=0,83	
PRDM-16	1,09 \pm 0,04	1,21 \pm 0,06	1,21 \pm 0,21	p=0,54	
Pgc1 α	1,04 \pm 0,01	1,19 \pm 0,30	0,90 \pm 0,16	p=0,52	
Cox5b	1,03 \pm 0,01	1,13 \pm 0,30	0,84 \pm 0,10	p=0,23	
Tmem26	1,06 \pm 0,03	1,12 \pm 0,32	1,98 \pm 0,74	p=0,60	
CD40	1,05 \pm 0,01	1,00 \pm 0,24	1,34 \pm 0,66	p=0,98	
LEP	1,03 \pm 0,01	0,90 \pm 0,28	0,53 \pm 0,15	p=0,07	IN [#] <CH
ADIPOQ	1,05 \pm 0,02	0,94 \pm 0,22	0,78 \pm 0,19	p=0,42	

*(p \leq 0,05), [#](p<0,10),

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Obesos/Sem intervenção IF: Obesos/Inatividade Física MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

Tabela 11. Expressão dos genes relacionados a termogênese no tecido adiposo marrom e branco entre os grupos, considerando o grupo controle (CC) como calibrador. Dados apresentados como média \pm EPM.

TAM	CC	CH	MO	IN	ANOVA	Post-Hoc*
UCP1	1,05 \pm 0,01	2,24 \pm 0,27	0,82 \pm 0,09	0,80 \pm 0,09	p<0,01	MO,IN<CH
TAB						
UCP1	1,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,05	0,35 \pm 0,25	0,37 \pm 0,24	p=0,10	
Cidea	1,03 \pm 0,01	0,59 \pm 0,18	0,68 \pm 0,25	0,51 \pm 0,10	p=0,11	
PRDM-16	1,14 \pm 0,05	3,02 \pm 1,16	2,27 \pm 0,12	2,28 \pm 0,40	p=0,12	
Pgc1 α	1,03 \pm 0,01	1,96 \pm 0,56	1,83 \pm 0,46	1,39 \pm 0,24	p=0,26	
Cox5b	1,02 \pm 0,01	1,59 \pm 0,30	1,60 \pm 0,42	1,19 \pm 0,14	p=0,32	
Tmem26	1,08 \pm 0,03	2,24 \pm 0,36	2,22 \pm 0,64	3,94 \pm 1,47	p \leq 0,05	IN,CH>CC
CD40	1,10 \pm 0,04	1,60 \pm 0,35	1,35 \pm 0,32	1,82 \pm 0,89	p=0,71	
LEP	1,03 \pm 0,01	35,10 \pm 13,55	21,63 \pm 6,58	12,68 \pm 3,63	p<0,01	MO,CH>CC
ADIPOQ	1,02 \pm 0,01	3,01 \pm 0,85	2,26 \pm 0,53	1,86 \pm 0,45	p=0,19	

*(p \leq 0,05)

CC: Dieta Controle/Sem intervenção CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta Hiperlipídica/Inatividade Física MO: Dieta Hiperlipídica/Exercício Moderado Contínuo IN: Dieta Hiperlipídica/Exercício Intenso Intervalado

7 DISCUSSÃO

7.1 GANHO DE PESO

Inicialmente, é importante considerar se o requisito fundamental antes do protocolo de treinamento físico (indução da obesidade pela dieta) foi alcançado. No início do estudo os animais tinham quatro semanas de idade e apresentavam pesos estatisticamente semelhantes. Entretanto, após receberem dieta hiperlipídica (CH, MO e IN), ganharam significativamente mais peso (+60%) do que os animais que receberam dieta controle (CC). Segundo o fornecedor (PragSoluções®), a dieta hiperlipídica é constituída de 57,2% de lipídios e tem, aproximadamente, 20% a mais de calorias por grama em comparação com a dieta controle. O fato dos animais do grupo DHL terem consumido mais energia (kJ) ocasionou o maior ganho de peso nestes grupos, alcançando-se assim o efeito esperado de indução de obesidade após 20 semanas.

Outros estudos que objetivaram a indução da obesidade com o uso de dieta hiperlipídica observaram ganhos semelhantes de peso. Uma revisão sistemática realizada por Rosini, da Silva, & Moraes (2012) relatou mudanças significativas no peso corporal de roedores com utilização de dietas hiperlipídicas/hipercalóricas em períodos que variaram entre 8 a 20 semanas, concluindo que o modelo de obesidade induzida por dieta é eficiente para o estudo da fisiopatologia dos parâmetros metabólicos relacionadas a obesidade (57).

Durante os protocolos de treinamento, era esperado que o maior gasto energético diário destes grupos pudesse auxiliar no controle do peso em comparação aos controles, como de fato ocorreu. Apesar dos animais continuarem ganhando peso e estarem consumindo mais energia proveniente da dieta, ambos os grupos de treinamento (MO e IN) ganharam significativamente menos peso do que o controle (CC).

Semelhantemente, Palmer, Bakos, Owens, Setchell, & Lane (2012) observaram os efeitos de um protocolo de treinamento longo, de 18 semanas de natação em camundongos e concluíram que o treinamento, isoladamente, não foi capaz de diminuir o peso corporal dos animais (58). No entanto, o autor também observou que ambos os grupos controles que não realizaram treinamento (CC e CH) acabaram aumentando em o peso corporal (+10%).

Os resultados encontrados no presente estudo podem ser analisados como estando em acordo com uma revisão sistemática acompanhada de meta-análise, publicada em 2011 por Thorogood e colaboradores (59). Esta revisão avaliou a perda de peso em pessoas obesas e concluiu que, mesmo seguindo as recomendações mínimas, o treinamento físico, isoladamente, não era capaz de promover uma perda de peso satisfatória. No presente estudo, há que se considerar que este fato também ocorreu, mas em situação de ingestão livre de energia proveniente da dieta (*ad libitum*), ou seja, na qual não era prevista a manutenção de igualdade no consumo alimentar para se testar o efeito isolado dos protocolos de exercício. Adicionalmente, o protocolo de treinamento utilizado no presente estudo seguiu a recomendação do Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) para perda de peso, que é de no mínimo 60 min de atividade física de intensidade moderada, durante cinco dias na semana (60). Portanto, ambos os protocolos de treinamento foram capazes de atenuar o ganho de peso em relação ao controle (CC), mesmo que concomitante a maior ingestão calórica, o que reforça o benefício dos protocolos de treinamento no controle de peso

Ao comparar a eficácia dos dois tipos de treinamento, observou-se que, do ponto de vista estatístico, somente o grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade moderada ganhou menos peso que o grupo controle-obesos (CH). Esse fato poderia sugerir uma maior eficácia do MICT em comparação ao HIIT no controle do peso em animais obesos. Contudo, uma revisão com meta-análise observou que ambos os protocolos produzem efeitos semelhantes na perda de peso em seres humanos, mas ainda assim os efeitos não foram clinicamente relevantes (-1,5 kg) (61).

7.2 APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA

A melhoria da aptidão cardiorrespiratória tem sido um objetivo em diversos estudos, uma vez que este desfecho está relacionado diretamente à melhoria da saúde e de diversos parâmetros metabólicos e funcionais (62, 63). A aptidão cardiorrespiratória é pelo menos tão importante quanto os fatores de risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares verificados na prática clínica diária, como a pressão alta, a diabetes tipo 2, o tabagismo e a obesidade. Independentemente do método de mensuração e do desenho do estudo, ter uma

aptidão cardiorrespiratória alta ou moderada está relacionado a uma redução na mortalidade por todas as causas. Apesar de a aptidão cardiorrespiratória apresentar relação com a idade, com o gênero e com a genética, a maneira mais fácil e mais acessível de aumentar este componente, é simplesmente praticar atividade física (64). Um estudo populacional publicado por Wang et al., (2010), demonstrou que pessoas obesas apresentavam uma aptidão cardiorrespiratória 10-15% menor em comparação a pessoas com peso normal, demonstrando ainda mais a importância de pesquisas voltadas para esta população (65).

Assim, no presente estudo, ambos os grupos submetidos ao treinamento (MO e IN) aumentaram em cerca de 4 vezes suas distâncias percorridas no teste de rampa após o protocolo de treinamento físico, em comparação ao controle-obesos (CH). Estes achados indicam que a obesidade dos camundongos não impediu o ganho de aptidão cardiorrespiratória. Importante observar também que o teste de rampa realizado na esteira é considerado um método eficiente, não invasivo e com bom custo-efetivo de avaliação funcional da aptidão cardiovascular em camundongos da linhagem c57bl/6 com obesidade induzida pela dieta (66).

A obesidade e a aptidão cardiorrespiratória são fatores de risco cardiovascular independentes. Apesar de estudos epidemiológicos já terem demonstrado que a obesidade é preditora de mortalidade, é possível que ela exerça menos influência do que se costuma pensar, como no estudo longitudinal de McAuley et al. (2012) que avaliou dados clínicos de quase 10 mil homens (67) Os autores deste estudo avaliaram o risco de morte prematura por eventos cardiovasculares, e observaram que o risco entre os mais obesos não foi necessariamente maior dos que os menos obesos nesta população, mas que, por outro lado, este risco esteve intimamente associado a aptidão cardiorrespiratória. Os autores também utilizaram uma estimativa da aptidão cardiorrespiratória através de um teste de esteira adaptado cujo ponto de interrupção e de cálculo também estava associado à exaustão física, como no presente estudo. Seguindo o mesmo raciocínio, uma meta-análise sobre o assunto observou que indivíduos que eram obesos mas que tinham uma boa aptidão física apresentavam um risco de mortalidade similar ao de indivíduos com peso normal mas que tinham baixa aptidão física, dando sentido ao termo “paradoxo da obesidade” e enfatizando a necessidade de políticas públicas focarem, prioritariamente, em intervenções clínicas baseadas no aprimoramento da aptidão física (68).

Em relação ao tipo de treinamento, houve vantagem do protocolo MICT sob a capacidade cardiorrespiratória, em comparação ao HIIT, pois o aumento no grupo MO foi 2 vezes maior em comparação ao do grupo controle. Os resultados foram confirmados pela massa do coração que também foi quase duas vezes maior no mesmo grupo, mas em comparação ao grupo controle-obesos (CH). Já está bem descrito na literatura que o aumento na massa do coração de roedores é uma resposta de adaptação fisiológica do sistema cardiovascular a protocolos de exercício, como no estudo de Buss et al. (2012), que verificaram diferença significativa na massa do coração de ratos, após 4 semanas de exercício moderado na esteira, em comparação com o controle (69). No presente estudo, o aumento na massa do coração foi, portanto, coerente com o aumento na distância máxima percorrida no teste de rampa. Apesar de os dados encontrados indicarem que o aumento na massa do coração foi positivo, há de se considerar que não foi possível verificar diretamente alguns parâmetros funcionais do coração, como a função ventricular. Apesar de contraditório, existe também o risco de a maior massa do coração encontrada indicar um aumento da massa ventricular esquerda associada a obesidade. Considerando esta última hipótese, haveria então um risco aumentado de desenvolvimento de doenças coronarianas, como na associação encontrada por Korre et al. (2016), que verificaram que reduzir em apenas uma unidade o IMC seria suficiente para reduzir em uma unidade g/m a massa ventricular esquerda de homens bombeiros, contribuindo assim para a redução no risco de doenças cardiovasculares e morte prematura (70).

Todavia, a possível vantagem com relação a capacidade cardiorrespiratória no grupo que realizou MICT não encontra o devido suporte na literatura dos últimos anos, que está cada vez mais consistente com o fato de que a melhora na capacidade cardiorrespiratória seria intensidade-dependente (71). De acordo com Haram et al. (2009), ratos foram selecionados artificialmente pela baixa capacidade aeróbia por 15 gerações, para avaliar os efeitos comparativos entre diferentes protocolos de treinamento e concluíram que o ganho na capacidade aeróbia ($VO_2\text{max}$) dos animais submetidos ao HIIT foi quase duas vezes maior do que no MICT. No mesmo sentido, mas em seres humanos, um artigo publicado em 2017 por Robinson et al., confirmou que o HIIT aumentou em 28% o $VO_2\text{pico}$ de homens jovens saudáveis, sendo superior ao aumento de 17% ocasionado pelo MICT, após 12 semanas (72). É possível que, por serem obesos, os camundongos possam ter

se adaptado melhor ao treinamento com intensidade mais baixa. No entanto, são necessários mais estudos para verificar outras possíveis causas que podem estar relacionadas a outros fatores intervenientes como: o animal utilizado no estudo, o tipo de treinamento (intervalado) e até mesmo a idade dos animais no estudo durante a execução do protocolo de treinamento físico (24-32 semanas).

Ao analisar os resultados obtidos no teste de rampa antes do início do protocolo de treinamento físico, foi observada uma performance 25% maior do grupo controle (CC) com relação aos três grupos de animais obesos (CH, MO, IN). Portanto, o peso dos camundongos foi um importante fator a se considerar, não somente com relação a capacidade cardiorrespiratória inicial, mas também nos ganhos de performance devido a diferentes tipos de treinamento. É importante mencionar que a distância máxima percorrida no teste de rampa é uma medida da capacidade funcional dos animais e, apesar de estar relacionada a capacidade aeróbia, não é uma medida direta da captação do volume máximo de oxigênio (VO_2max).

7.3 TECIDO ADIPOSEO

A pesagem dos tecidos de interesse possibilitou a identificação de diferenças importantes entre os grupos experimentais, que foram analisadas juntamente com a expressão de RNA de genes termogênicos do tecido adiposo e da enzima AMPK no tecido muscular.

No presente estudo, o treinamento intervalado de alta intensidade, especificamente, pareceu interferir na massa do TAM. A massa do TAM do grupo (IN) submetido ao protocolo de HIIT foi 59% maior do que o grupo controle (CC), mas não houve diferenças em relação aos outros grupos. Da mesma forma, um estudo realizado por Eguchi et al. (2008), avaliou os efeitos de 8 semanas de MICT de natação em ratos e observou um aumento de 2,5 vezes na massa do TAM, tanto em relação ao grupo de animais controle obesos quanto não obesos (73). Em sua dissertação de mestrado, Leite (2014) avaliou mudanças na composição corporal de ratos através de densitometria radiológica (DEXA) e observou um aumento semelhante ao do estudo anterior na massa do TAM dos animais submetidos a um protocolo de MICT (uma hora por dia, 5 vezes por semana) na água (74). No entanto, não são claros os significados clínicos dessas mudanças, uma vez que o

aumento da massa do tecido poderia não estar diretamente relacionado à sua função.

Para isso, foi analisada a expressão gênica da proteína que caracteriza o TAM e sua função termogênica, denominada UCP1. A UCP1 de ambos os grupos submetidos ao treinamento físico (MO e IN) apresentaram uma expressão cerca de 60% menor em relação ao controle-obesos (CH). Flouris e colaboradores (2017) realizaram recente revisão sistemática que incluiu oito estudos que avaliaram os efeitos induzidos pelo treinamento físico na UCP1 do TAM. Apesar dos resultados encontrados serem considerados controversos por conta das diferenças entre os protocolos de treinamento nos artigos publicados, eles indicam que o treinamento físico não induziu respostas adaptativas em animais magros, mas que haveria a possibilidade de observar alterações na UCP1 do TAM em animais obesos (28).

O TAM tem sido fonte de uma quantidade crescente de pesquisas nos últimos anos, devido a sua redescoberta como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças associadas a obesidade, uma vez que ele tem um potencial de aumentar consideravelmente o gasto energético corporal (75). No entanto, de acordo com Tsiloulis & Watt (2015), parece inconsistente e contra produtivo projetar uma ineficiência da utilização de substratos energéticos por modificação de mecanismos moleculares via adaptações ao exercício, os quais justamente aumentam a eficiência energética em vários tecidos, principalmente no tecido muscular (25). Há de se considerar o modo como é feita a indução da ativação deste tecido, tendo em vista seu caráter energeticamente ineficiente e fisiologicamente desfavorável (76). Assim, parece provável que os efeitos do treinamento físico em nível molecular possam envolver vias moleculares bem diferentes, por exemplo, daquelas que seriam ativadas no tecido adiposo, por indução pelo frio ou por compostos termogênicos. Mais estudos com diferentes modelos experimentais são necessários para esclarecer os efeitos diretos ou indiretos, via comunicação com outros tecidos, como o músculo esquelético, do treinamento físico sobre os diferentes compartimentos do tecido adiposo.

Os resultados do presente estudo demonstraram uma clara diminuição da expressão do gene UCP1 no TAM e não um aumento, e ainda, em direção a valores similares ao grupo controle. Os resultados ganham suporte devido a correlação negativa ($r = -0,645$) entre a distância percorrida e a transcrição de UCP1 no TAM

($p < 0,01$), indicando que ganhos na aptidão física possam levar a diminuição da ativação termogênica específica neste tecido (Figura 14).

Um artigo de revisão publicado por Tsiloulis & Watt (2015) observou que tanto a dieta hiperlipídica quanto o frio podem induzir ativação simpática do sistema nervoso central e conseqüentemente ativar a termogênese no TAM, provocado pela dissipação de energia química na forma de calor via ações da proteína UCP1. Consistentemente, os animais controles-obesos (CH) do presente estudo apresentaram uma expressão da UCP1 no TAM duas vezes maior em relação ao controle. Interessantemente, não houve diferença entre a expressão da UCP1 entre os animais obesos treinados e os animais controle, sugerindo que o treinamento atenuou ou até mesmo reverteu os efeitos da termogênese induzida por dieta, o que parece fisiologicamente plausível, uma vez que uma grande quantidade de calor é produzida devido às contrações musculares ao longo do tempo.

Um estudo recente de N. Wang, Liu, Ma, & Wen (2017) foi realizado utilizando um protocolo muito semelhante ao empregado no presente estudo, comparando os efeitos de 8 semanas de diferentes protocolos de treinamento em camundongos com obesidade induzida por dieta. Os autores concluíram que o HIIT foi superior na perda de peso corporal e na expressão de UCP1 no TAM, assim como uma expressão duas vezes maior de UCP1 e Prdm-16 no TAB subcutâneo em comparação com o MICT (77).

No entanto, as alterações no metabolismo dos lipídeos associadas ao treinamento físico podem divergir bastante entre os estudos, os quais muitas vezes utilizam protocolos de treinamento com diferenças relevantes entre eles. Sepa-Kishi & Ceddia (2016) observaram que o treinamento físico não aumentou a termogênese no TAM, mas, por outro lado, foi capaz de promover o amarronzamento do TAB subcutâneo (78) Interessantemente, os autores sugerem que o exercício poderia deslocar a termogênese do centro do corpo (onde geralmente é ativada pela indução ao frio e pela dieta hiperlipídica) para as áreas periféricas. Além disso, a ativação do TAM estaria relacionada essencialmente ao mecanismo de não tremor (79), reforçando a hipótese de que o exercício estaria relacionado aos mecanismos de tremor, pois ambos envolvem contração muscular (27).

O amarronzamento do TAB poderia ser então um potencial alvo terapêutico, contribuidor do aumento do gasto de energia e diminuição da obesidade. No entanto, não houve diferenças entre os grupos experimentais do presente estudo,

independentemente do treinamento, em relação a expressão dos genes UCP1, Prdm-16, Cidea, e Pgc1 α . É possível que o amarronzamento do TAB subcutâneo pelo exercício esteja relacionado a efetiva perda de peso dos animais, considerando a correlação inversa encontrada no presente estudo (-0,764) entre massa do tecido adiposo subcutâneo e a expressão de UCP1 neste mesmo tecido (Figura 15). Todos os grupos de animais obesos (CH, MO e IN) apresentaram uma massa do TAB subcutâneo (depósito inguinal) cerca de duas vezes maior em relação ao controle (CC), indicando que a dieta teve possivelmente maior influência sobre esta variável do que o treinamento.

O excesso de massa do TAB visceral é considerado um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim, um estudo realizado por Motta, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda (2016) demonstrou que o grupo de camundongos submetidos ao HIIT apresentou uma redução na adiposidade visceral após 12 semanas (80). No entanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais com relação as massas do TAB visceral (epididimal e retroperitoneal), independentemente do protocolo de treinamento. Podemos inferir que o tempo de treinamento de 8 semanas do presente estudo pode não ter sido suficiente para se observar as mudanças esperadas nesta variável. O tipo de treinamento do estudo anterior também foi diferente pois utilizou um protocolo de natação ao invés de esteira, além de uma amostra maior (10 animais por grupo), aumentando a possibilidade de detecção de mudanças estatisticamente significantes.

Um estudo publicado em 2014 por Norheim et al., avaliou os efeitos de 12 semanas de treinamento combinado (treinamento de força + corrida) sobre o amarronzamento do TAB subcutâneo de homens de meia idade, com peso normal e com sobrepeso (81). Segundo os autores, houve um aumento de quase duas vezes na expressão de UCP1 no TAB subcutâneo tanto em indivíduos magros quanto com sobrepeso. Não foram encontradas diferenças na expressão de Pgc1 α , assim como em genes seletivos de adipócitos bege como Prdm-16 e Tmem26 em nenhum dos grupos. Os autores deste estudo observaram um aumento de 1,8 vezes na Pgc1 α e de 1,2 vezes no Tmem26 apenas quando considerados os dados de ambos os grupos de treinamento juntos.

Outro estudo, publicado em 2016 por Rocha-Rodrigues et al., avaliou os efeitos do MICT no TAB subcutâneo de ratos com obesidade induzida por dieta. Os

autores observaram uma diminuição na expressão relativa da proteína UCP1 devido a DHL, que foi atenuada pelo treinamento físico (82). Os autores não observaram aumento na expressão de Prdm-16 e Tmem26 em ratos obesos em comparação aos controles, mas foi observado um aumento da expressão de Cidea tanto em ratos obesos quanto em magros após o MICT.

Ainda não foram esclarecidas as mudanças provocadas pelo exercício crônico na atividade termogênica do tecido adiposo, mas especula-se que elas dependam do tipo de treinamento e das características do tecido. As adaptações podem ter respostas complexas e, por muitas vezes, opostas, devendo ser avaliadas de acordo com natureza do exercício, tempo de treinamento, função fisiológica, estado energético, composição corporal basal e outros fatores ambientais e genéticos inter-relacionados.

Os hormônios leptina e *adiponectina* ajudaram a redefinir a função do tecido adiposo, que passou de um mero depósito de energia para um órgão endócrino capaz de influenciar diretamente no metabolismo. Estudos em animais demonstraram que a leptina seria um importante regulador do apetite e, conseqüentemente, do peso corporal. Por isso, tanto em animais quanto em seres humanos, existe uma grande produção deste hormônio em situações de obesidade induzida por dieta, mas que não são acompanhadas pela diminuição da ingestão de energia da dieta, levando à hipótese de uma situação de resistência à leptina (44).

Esta situação pode ser confirmada nos resultados do presente estudo, quando foi demonstrada uma expressão do gene LEP no TAB subcutâneo cerca de 30 vezes maior no grupo controle-obesos (CH) em comparação ao controle (Figura 26C) e cerca de 20 vezes maior no grupo que realizou treinamento contínuo de intensidade moderada (MO) em relação ao controle (CC) (Figura 26B). Já no grupo que realizou HIIT, a expressão do gene LEP foi menor do que o controle-obesos (CH), levantando a hipótese de que o HIIT teria atenuado a expressão do gene LEP neste tecido.

É sabido que altas concentrações de leptina circulante estão associadas ao surgimento de doenças relacionadas a obesidade como a hipertensão, via ativação do sistema nervoso simpático (45) e ainda, que baixas concentrações estão relacionadas a um estado de déficit de energia no organismo. Coerentemente, os

resultados sugerem que o HIIT pode gerar um maior gasto de energia devido aos esforços intervalados de alta intensidade (90% do máximo). Este déficit aumentado traria alterações metabólicas importantes para a manutenção da homeostase energética. Vale ressaltar que os animais do grupo IN tiveram expressão do gene LEP no TAB em magnitude semelhante ao dos animais magros do grupo controle (CC) (Figura 26B), o que corrobora com a hipótese de um efeito de proteção apesar do ganho de gordura subcutânea induzida por dieta hiperlipídica no grupo submetido ao HIIT.

Vieira, Valentine, Wilund, & Woods (2009) realizaram um estudo com camundongos machos submetidos a 12 semanas de treinamento contínuo de intensidade moderada, na esteira. Neste caso, não houve diferenças entre os grupos experimentais e os controles, independentemente do tipo de dieta ou do treinamento (83). Portanto, é possível que sejam necessárias maiores intensidades de treinamento, como no HIIT, para que sejam observadas diferenças na expressão do gene LEP com relação ao grupo controle.

Adiponectina é um hormônio secretado pelo TAB e tem relação direta com a sensibilidade a insulina e a eficiência energética. Mais especificamente, a *adiponectina* age na oxidação de ácidos graxos e no aumento de AMPK no músculo. No entanto, a literatura atual ainda apresenta muitas inconsistências com relação ao seu papel no exercício crônico, em comparação ao exercício agudo (46). Um estudo realizado por Ritchie, Wright, & Dyck (2014) utilizou camundongos ADIPOQ-knockout e concluiu que ela não estava relacionada ao peso corporal, assim também como não era necessariamente requerida para gerar adaptações metabólicas relacionadas ao exercício crônico (84). É possível associar estes achados aos do nosso estudo. Pode-se sugerir, novamente, a possibilidade de que estamos diante de um mecanismo compensatório, considerando que não houve diferença na expressão de ADIPOQ entre os grupos experimentais, independentemente da dieta e do protocolo de treinamento.

7.4 TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

De acordo com uma revisão sistemática realizada por Fiuza-Luces et al (2013), o exercício seria uma espécie de “pílula polivalente”. Esta pílula seria “manufaturada” pelo tecido muscular esquelético. Ainda, os dados apresentados

pelos autores desta revisão indicam que o exercício físico realizado de maneira crônica modula a produção de moléculas derivadas do músculo, conhecidas como miocinas, as quais exercem efeitos parácrinos ou endócrinos diversos (19).

Rocha-Rodrigues et al. (2016) observaram uma relação entre a ativação da AMPK no músculo gastrocnêmio com o amarronzamento do tecido adiposo subcutâneo de ratos submetidos a dieta hiperlipídica (82). Os autores verificaram que, após oito semanas, o MICT atenuou a hipertrofia dos adipócitos promovida pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica, assim como aumentou também a expressão de AMPK no músculo gastrocnêmio. Por outro lado, no presente estudo, a expressão de AMPK detectada nos músculos esqueléticos foi muito baixa e não foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais na ativação da AMPK, independentemente da intensidade de treinamento, tanto no músculo gastrocnêmio quanto no músculo sóleo. Ao comparar os protocolos, é preciso considerar a diferença no tempo de eutanásia e coleta dos tecidos de 48 h com a do presente estudo, que foi de 96 h após a última sessão de exercício. É possível que 48 h não seja tempo suficiente para evitar os efeitos agudos da última sessão de exercício para este desfecho, nestas condições experimentais.

McConell et al. (2005) avaliaram os efeitos de duas semanas de treinamento na bicicleta ergométrica e observaram que o treinamento atenuou as expressões das proteínas AMPK α 1 e AMPK α 2 no músculo vasto lateral em humanos. Os autores observaram que o treinamento aboliu em 11 vezes o aumento da fosforilação da AMPK α 2 no músculo, o que levou a conclusão de que, existe pouca ativação da AMPK após treinamento crônico, assim como devem haver outros fatores importantes com relação a captação de glicose (85). O exercício físico crônico poderia então aumentar o glicogênio muscular, diminuindo ainda mais a ativação da AMPK em indivíduos treinados, caracterizando possivelmente uma resposta adaptativa (86). No entanto, existe a possibilidade de este aumento ser ainda menor em obesos, devido à resistência à insulina e sua deficiência no metabolismo da glicose. Interessantemente, a AMPK é ativada em esforços máximos de curta duração ou em esforços moderados de longa duração, ambas as situações nas quais há depleção de glicogênio e ativação das fibras rápidas, obedecendo o limiar de excitabilidade (50). No entanto, não foram encontradas diferenças entre os protocolos de treinamento no presente estudo, indicando que o

espaço de tempo entre a última sessão de exercícios (96 h) possibilitou a recuperação total dos depósitos de glicogênio do músculo.

Com relação a massa dos músculos analisados, é importante relatar que os músculos gastrocnêmio e sóleo possuem diferentes características quanto ao tipo de fibra muscular. O músculo gastrocnêmio é um músculo composto por fibras do tipo 2, com características essencialmente glicolíticas e maiores respostas a treinos de alta intensidade. Por outro lado, o músculo sóleo possui fibras musculares do tipo 1, com características essencialmente oxidativas e que respondem melhor ao treinamento de intensidade moderada ou baixa (87). Com relação à massa do músculo gastrocnêmio, o grupo que realizou MICT foi 40% menor do que o grupo controle. Por outro lado, o grupo que realizou HIIT (IN) apresentou uma massa do gastrocnêmio similar ao controle (CC). Com relação a massa do músculo sóleo, não houve diferenças entre os grupos experimentais. Por ser um treinamento de intensidade alta, é possível que o HIIT tenha evitado a perda de fibras musculares com características glicolíticas.

Ao avaliar os tecidos musculares, foi observada uma associação com a massa do testículo que é importante destacar. Na comparação entre os grupos experimentais, a massa dos testículos dos grupos controle-obesos (CH) e MO foi menor (-48% e -37%, respectivamente) que o grupo controle (CC), mas não em relação ao grupo que fez exercício intervalado de alta intensidade (IN). O testículo é o órgão efetor do eixo reprodutivo masculino, e principal responsável pela produção total de testosterona. Reduções no volume testicular podem estar associadas a redução global da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (88). Assim, é possível sugerir que a redução do volume testicular possa estar associada a efeitos deletérios da obesidade sobre eixo reprodutivo, que também persistiram no grupo que fez exercício moderado (MO). Adicionalmente, especula-se que o exercício de alta intensidade (IN) possa ter efeito protetor na redução da massa testicular associada à obesidade em camundongos. Em conjunto, esses achados abrem perspectivas de investigação quanto aos possíveis efeitos da intensidade de esforço sobre a função testicular na obesidade. Neste sentido, You, Disanzo, & Arsenis (2013) demonstraram que oito semanas de exercício contínuo de intensidade moderada foram capazes de elevar as concentrações de testosterona plasmática em ratos geneticamente obesos (89). Como os dados sobre a massa do testículo não

foram relativizados pelo peso dos animais no estudo destes autores, não foi possível comparar com os resultados do presente estudo. O mesmo autor atribui o aumento das concentrações de testosterona nos animais obesos a mudanças positivas em marcadores moleculares relacionados ao estado inflamatório do tecido adiposo inguinal e epididimal (expressão da proteína *Mcp-1*).

No presente estudo, houve uma correlação moderada entre a massa do testículo e o músculo gastrocnêmio ($r=0,649$; $p\leq 0,05$) que pode reforçar a ideia de que a composição corporal como um todo, e, mais precisamente, alterações na massa muscular magra também possam estar associadas à manutenção fisiológica do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

Fan et al. (2015) avaliaram os efeitos de 10 semanas de DHL em camundongos c57bl/6 machos e verificaram que, além de levar à obesidade, a dieta levou a um decréscimo na fertilidade e afetou negativamente as concentrações de testosterona, estradiol e LH, em comparação com o grupo que recebeu dieta controle (90). Adicionalmente, um estudo realizado por Garekani et al (2012), demonstrou uma diminuição nas concentrações de testosterona em ratos magros saudáveis quando submetidos a exercício intervalado de alta intensidade, levando a hipótese de que podem existir diferenças importantes nos resultados esperados com relação a presença ou não da obesidade, assim como na intensidade do exercício (91). A literatura atual ainda é muito escassa sobre este assunto e são necessários mais estudos que analisem este desfecho.

7.5 LIMITAÇÕES

Apesar de terem sido tomados os cuidados quanto a seleção dos animais do estudo e no planejamento dos protocolos, houve limitações quanto a extrapolação e interpretação dos resultados do estudo, assim também quanto a necessidade de exclusão de um grupo de animais previsto para representar um modelo de inatividade física (IF).

Os dados do grupo IF não foram considerados para o presente estudo (dados disponíveis para consulta no Apêndice A), porque os animais deste grupo apresentaram sinais de estresse e perda de peso, e, portanto, não completaram o protocolo previsto inicialmente. Além disso, não foi possível medir com precisão o consumo de dieta e água destes animais devido a complicações na coleta e

mensuração destes materiais deste grupo, que dependiam de uma adaptação na gaiola (Figura disponível no Apêndice A)

Foi utilizado, para mensuração das concentrações de testosterona total plasmática, o método de ensaio imunoenzimático competitivo (kit ELISA, Abcam®). As concentrações de testosterona plasmática apresentaram valores médios bastante contestáveis, com erros-padrão significativamente elevados. Devido à inconsistência nos valores apresentados, esta variável foi então desconsiderada para fins de análise inferencial. É possível que o método da coleta de sangue tenha danificado as amostras, uma vez que muitas apresentaram padrões de baixa qualidade e indícios de degradação celular (hemólise). Dados disponíveis no Apêndice B.

Importante ainda ressaltar que o tamanho da amostra em cada grupo pode ter limitado algumas comparações. Frente a diferentes comparações que ficaram no nível de tendência de significância estatística e de suas relevâncias científicas na melhor compreensão dos efeitos (isolados e/ou associados) da obesidade e do exercício em funções orgânicas vitais e metabolismo, novos experimentos se fazem necessários.

Além disso, é preciso cuidado na interpretação dos resultados, pois a análise da expressão gênica pode não reproduzir a ativação direta das proteínas de interesse nos tecidos, principalmente *in vivo*, como demonstrado em estudos anteriores.

8 CONCLUSÕES

- Antes do protocolo de treinamento físico, houve a esperada indução de obesidade nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, que ocorreu após um período de 20 semanas.
- Durante o protocolo de treinamento físico, o maior ganho de peso esteve associado a menor capacidade aeróbia, menor massa do músculo gastrocnêmio e menor massa testicular, assim como maior TAB subcutâneo. Interessantemente, o ganho de peso, inclusive em animais submetidos à dieta controle, enfatiza a importância de ser fisicamente ativo para prevenir a obesidade
- Quando o objetivo foi a alteração de componentes da aptidão física relacionada a saúde, como atenuação do ganho de peso e melhora da capacidade cardiorrespiratória em camundongos obesos, o MICT foi superior ao HIIT.
- Houve aumento da massa do TAM do grupo que realizou HIIT, em relação ao controle. Mas, interessantemente, a maior massa do TAM não esteve associada a maior expressão de genes relacionadas a termogênese, e sim em uma menor ativação da UCP1 em ambos os grupos de treinamento.
- No TAB, não houve diferenças entre os grupos com relação a ativação dos principais genes marcadores de termogênese, independentemente da dieta ou do protocolo de treinamento. No entanto, o grupo que realizou HIIT apresentou uma maior expressão do gene seletivo de adipócitos bege (Tmem26), assim com uma menor expressão do hormônio leptina.
- Não houve diferenças entre os grupos experimentais na expressão da proteína AMPK nos músculos gastrocnêmio e sóleo, independentemente da dieta ou protocolo de treinamento.

- A dieta teve grande influência, tanto na aptidão física relacionada a saúde, quanto na alteração de parâmetros metabólicos dos tecidos estudados em camundongos com obesidade induzida por dieta. Estas alterações puderam ser atenuadas ou até mesmo revertidas ao estado ideal (similar ao controle) pelo exercício crônico.

- As vantagens apresentadas por um ou outro protocolo de treinamento dependeram especificamente do desfecho observado. Muitos efeitos moleculares ainda necessitam ser analisados para melhor elucidação dos mecanismos de ação do exercício físico sob o ponto de vista fisiopatológico, considerando o exercício como “medicamento”. Diferentes protocolos de treinamento produzem efeitos fisiológicos variados, tal como “medicamentos” com diferentes princípios ativos e posologias.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804–14.
2. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126(1):126–32.
3. Haslam DW, James PT. Obesity. *Lancet*. 2005;366:1197–209.
4. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2006;444(7121):840–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167471>
5. Malta DC, Stopa SR, Iser BPM, Bernal RTI, Claro RM, Nardi ACF, et al. Risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey in capitals of Brazil, Vigitel 2014. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2015;18 Suppl 2:238–55. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2015000700238&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
6. Doytch N, Dave DM, Kelly IR. Global evidence on obesity and related outcomes: An overview of prevalence, trends, and determinants. *East Econ J* [Internet]. 2014;42(1):7–28. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84948447697&partnerID=tZOtx3y1>
7. Popkin BM, Doak CM. The Obesity Epidemic Is a Worldwide Phenomenon. *Nutr Rev* [Internet]. 2009;56(4):106–14. Available from: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01722.x>
8. Brasil. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico - Vigitel 2016 [Internet]. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. 2017. 160p.: il. –(Série G. Estatística e Informação em. Available from: www.saude.gov.br/svs
9. Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1423–34.
10. Thornton JS, Frémont P, Khan K, Poirier P, Fowles J, Wells GD, et al. Physical activity prescription: a critical opportunity to address a modifiable risk factor for the prevention and management of chronic disease: a position statement by the Canadian Academy of Sport and Exercise Medicine. *Br J Sports Med*. 2016;50(18):1109–14.

11. Lightfoot JT, De Geus EJC, Booth FW, Bray MS, den Hoed M, Kaprio J, et al. Biological/Genetic Regulation of Physical Activity Level. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2017;1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005768-900000000-97047>
12. Thompson PD, Arena R, Riebe D, Pescatello LS. {ACSM's} new preparticipation health screening recommendations from {ACSM's} guidelines for exercise testing and prescription. *Curr Sport Med Rep*. 2013;12(4):215–7.
13. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath T V., L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110(10):1245–50.
14. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U, et al. Global physical activity levels: Surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*. 2012;380(9838):247–57.
15. Laursen PB, Jenkins DG. The Scientific Basis for High-Intensity Interval Training. *Sport Med* [Internet]. 2002;32(1):53–73. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00007256-200232010-00003>
16. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: A little pain for a lot of gain? Vol. 36, *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2008. p. 58–63.
17. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* [Internet]. 1985;100(2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920711%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1424733>
18. Mileski KS, Leitao JL, Lofrano-Porto A, Grossi-Porto LG. Health-related physical fitness in middle-aged men with and without metabolic syndrome. *J Sports Med Phys Fitness*. 2015;55(3):223–30.
19. Fiuza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the Real Polypill. *Physiology* [Internet]. 2013;28(5):330–58. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiol.00019.2013>
20. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. Vol. 17, *Cell Metabolism*. 2013. p. 162–84.
21. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463–8.
22. Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. Vol. 1842, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2014. p. 340–51.
23. Villarroya F. Irisin, turning up the heat. Vol. 15, *Cell Metabolism*. 2012. p. 277–

- 8.
24. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. Vol. 156, *Cell*. 2014. p. 20–44.
25. Tsiloulis T, Watt MJ. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2015. p. 175–201.
26. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016;13(1):26–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2016.136%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27616452>
27. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab*. 2014;19(2):302–9.
28. Flouris AD, Dinas PC, Valente A, Andrade CMB, Kawashita NH, Sakellariou P. Exercise-induced effects on UCP1 expression in classical brown adipose tissue: a systematic review. *Horm Mol Biol Clin Investig* [Internet]. 2017;0(0):1–13. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/hmbci.ahead-of-print/hmbci-2016-0048/hmbci-2016-0048.xml>
29. Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ. Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations. *Diabetes*. 2015;64(7):2361–8.
30. Spiegelman BM. Banting lecture 2012: Regulation of adipogenesis: Toward new therapeutics for metabolic disease. In: *Diabetes*. 2013. p. 1774–82.
31. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men 693. *Genes Dev*. 2009;23(1549–5477 (Electronic)):788–97.
32. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. p. 1252–63.
33. Frontini A, Cinti S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. Vol. 11, *Cell Metabolism*. 2010. p. 253–6.
34. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One*. 2012;7(11).
35. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab*. 2007;6(1):38–54.
36. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;360(15):1518–25. Available from:

- <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.109.064469%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357407>
37. Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine R V., et al. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes*. 2004;28(1):176–9.
 38. Puri V, Ranjit S, Konda S, Nicoloso SMC, Straubhaar J, Chawla A, et al. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2008;105(22):7833–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802063105>
 39. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–76.
 40. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2010;107(1):240–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0905310107>
 41. Guo C-A, Kogan S, Amano SU, Wang M, Dagdeviren S, Friedline RH, et al. CD40 deficiency in mice exacerbates obesity-induced adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *AJP Endocrinol Metab [Internet]*. 2013;304(9):E951–63. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00514.2012>
 42. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. Vol. 10, *Nature Reviews Endocrinology*. 2014. p. 24–36.
 43. Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631–4.
 44. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Vol. 395, *Nature*. 1998. p. 763–70.
 45. Wilding JPH. Leptin and the control of obesity. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1(6):656–61.
 46. Simpson KA, Singh MAF. Effects of exercise on adiponectin: A systematic review. Vol. 16, *Obesity*. 2008. p. 241–56.
 47. Wu W, Feng J, Jiang D, Zhou X, Jiang Q, Cai M, et al. AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine. *Sci Rep*. 2017;7.
 48. Lee-Young RS, Griffie SR, Lynes SE, Bracy DP, Ayala JE, McGuinness OP, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase is essential for the metabolic response to exercise in vivo. *J Biol Chem [Internet]*. 2009;284(36):23925–34. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2781986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Chen Z-P, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters L a, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes* [Internet]. 2003;52(9):2205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941758>
 50. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* [Internet]. 2009;418(2):261–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196246> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2779044>
 51. Niederberger E, King TS, Russe OQ, Geisslinger G. Activation of AMPK and its Impact on Exercise Capacity. Vol. 45, *Sports Medicine*. 2015. p. 1497–509.
 52. Taylor CW, Ingham SA, Hunt JEA, Martin NRW, Pringle JSM, Ferguson RA. Exercise duration-matched interval and continuous sprint cycling induce similar increases in AMPK phosphorylation, PGC-1 α and VEGF mRNA expression in trained individuals. *Eur J Appl Physiol*. 2016;116(8):1445–54.
 53. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* [Internet]. 1993;123(11):1939–51. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/123/11/1939/4722783>
 54. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V., Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6.
 55. Høydal M a, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(6):753–60.
 56. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim M, Al-Share QY, Waldum HL, et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res*. 2009;81(4):723–32.
 57. Rosini TC, da Silva ASR, Moraes C de. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2012;58(3):383–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423012705250>
 58. Palmer NO, Bakos HW, Owens J a, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high fat diet improves metabolic health and reverses perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;5005:768–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252945>

59. Thorogood A, Mottillo S, Shimony A, Filion KB, Joseph L, Genest J, et al. Isolated aerobic exercise and weight loss: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med*. 2011;124(8):747–55.
60. Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2009;41(2):459–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127177>
61. Keating SE, Johnson NA, Mielke GI, Coombes JS. A systematic review and meta-analysis of interval training versus moderate-intensity continuous training on body adiposity. Vol. 18, *Obesity Reviews*. 2017. p. 943–64.
62. Mileski KSL, Leitão JL, Lofrano-Porto A, Grossi Porto LG. Health-related physical fitness in middle-aged men with and without metabolic syndrome. *J Sports Med Phys Fitness*. 2015;55(3).
63. Brawner CA, Al-Mallah MH, Ehrman JK, Qureshi WT, Blaha MJ, Keteyian SJ. Change in Maximal Exercise Capacity Is Associated With Survival in Men and Women. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(3):383–90.
64. Lee D, Artero EG, Sui X, Blair SN. Review: Mortality trends in the general population: the importance of cardiorespiratory fitness. *J Psychopharmacol* [Internet]. 2010;24(4 Suppl):27–35. Available from: <http://jop.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1359786810382057>
65. Wang CY, Haskell WL, Farrell SW, Lamonte MJ, Blair SN, Curtin LR, et al. Cardiorespiratory fitness levels among US adults 20-49 years of age: findings from the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. 2010;171(4):426–35.
66. Petrosino JM, Heiss VJ, Maurya SK, Kalyanasundaram A, Periasamy M, Lafountain RA, et al. Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. *PLoS One*. 2016;11(2).
67. McAuley PA, Artero EG, Sui X, Lee D, Church TS, Lavie CJ, et al. The Obesity Paradox, Cardiorespiratory Fitness, and Coronary Heart Disease. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2012;87(5):443–51. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619612002662>
68. Barry VW, Baruth M, Beets MW, Durstine JL, Liu J, Blair SN. Fitness vs. fatness on all-cause mortality: A meta-analysis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(4):382–90.
69. Buss SJ, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Asel C, Zhang M, et al. Chronic Akt blockade aggravates pathological hypertrophy and inhibits physiological hypertrophy. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2012;302(2):H420–30. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00211.2011>
70. Korre M, Porto LGG, Farioli A, Yang J, Christiani DC, Christophi CA, et al.

- Effect of Body Mass Index on Left Ventricular Mass in Career Male Firefighters. *Am J Cardiol* [Internet]. 2016;118(11):1769–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914916314503%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27687051>
71. Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkaas M, et al. Aerobic high-intensity intervals improve $\dot{V}O_2\text{max}$ more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(4):665–71.
 72. Robinson MM, Dasari S, Konopka AR, Johnson ML, Manjunatha S, Esponda RR, et al. Enhanced Protein Translation Underlies Improved Metabolic and Physical Adaptations to Different Exercise Training Modes in Young and Old Humans. *Cell Metab.* 2017;25(3):581–92.
 73. Eguchi R, Cheik NC, Oyama LM, Do Nascimento CMO, De Mello MT, Tufik S, et al. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Rev Bras Med do Esporte.* 2008;14(3):182–7.
 74. Leite JP. O efeito do treinamento físico sobre a resistência à insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica: modulações de fatores inflamatórios sobre o tecido adiposo branco e marrom de ratos Wistar. 2014.
 75. Trayhurn P. Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. Vol. 134, *Biochimie.* 2017. p. 62–70.
 76. Tamucci KA, Namwanje M, Fan L, Qiang L. The dark side of browning. Vol. 9, *Protein and Cell.* 2018. p. 152–63.
 77. Wang N, Liu Y, Ma Y, Wen D. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. *Life Sci.* 2017;191:122–31.
 78. Sepa-Kishi DM, Ceddia RB. Exercise-Mediated Effects on White and Brown Adipose Tissue Plasticity and Metabolism. *Exerc Sport Sci Rev.* 2016;44(1):37–44.
 79. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. Vol. 13, *Nature Reviews Endocrinology.* 2017. p. 26–35.
 80. Motta VF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. High-Intensity Interval Training Beneficial Effects in Diet- Induced Obesity in Mice: Adipose Tissue, Liver Structure, and Pancreatic Islets. Efectos Benef del Entren con Intervalos Alta Intensidad en la Obes Inducida por Dieta en Ratones Tejido Adiposo, Estruct del Hígado e Islotes Pancreáticos [Internet]. 2016;34(2):684–91. Available from: <http://ezproxy.leedsbeckett.ac.uk/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=118780971&site=eds-live&scope=site>
 81. Norheim F, Langleite TM, Hjorth M, Holen T, Kielland A, Stadheim HK, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of

- subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.* 2014;281(3):739–49.
82. Rocha-Rodrigues S, Rodriguez A, Gouveia AM, Goncalves IO, Becerril S, Ramirez B, et al. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* 2016;165:100–8.
 83. Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Woods JA. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine.* 2009;46(3):339–45.
 84. Ritchie IRW, Wright DC, Dyck DJ. Adiponectin is not required for exercise training-induced improvements in glucose and insulin tolerance in mice. *Physiol Rep.* 2014;2(9).
 85. McConell GK, Lee-Young RS, Chen ZP, Stepto NK, Huynh NN, Stephens TJ, et al. Short-term exercise training in humans reduces AMPK signalling during prolonged exercise independent of muscle glycogen. *J Physiol.* 2005;568(2):665–76.
 86. Durante PE, Mustard KJ, Park S-H, Winder WW, Hardie DG. Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(1):E178–86.
 87. Macdougall JD, Elder GCB, Sale DGDG, Moroz JR, Sutton JR. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibres. *Eur J Appl Physiol* [Internet]. 1980;43(1):25–34. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00421352>
 88. Zamiri MJ, Khodaei HR. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. *Anim Reprod Sci.* 2005;88(3–4):245–55.
 89. You T, Disanzo BL, Arsenis NC. Aerobic exercise training attenuates obesity-related hypogonadism in male rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45(7):1244–51.
 90. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS One.* 2015;10(4).
 91. Morey ER. Spaceflight and Bone Turnover: Correlation with a New Rat Model of Weightlessness. *Source Biosci* [Internet]. 1979;29(3):168–72. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1307797>
<http://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp>
 92. Bey L, Hamilton MT. Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: A molecular reason to maintain daily low-intensity activity. *J Physiol.* 2003;551(2):673–82.
 93. Zderic TW, Hamilton MT, Theodore W, Physical MTH. Physical inactivity

- amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase activity. *J Appl Physiol* [Internet]. 2006;100(1):249–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195388>
94. Ferreira JA, Crissey JM, Brown M. An Alternant Method to the Traditional NASA Hindlimb Unloading Model in Mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2011;(49). Available from: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2467>

APÊNDICE A – GRUPO INATIVIDADE FÍSICA (IF)

1 GRUPO INATIVIDADE FÍSICA

1.1 MODELO DE INATIVIDADE FÍSICA

No modelo de inatividade física (IF), os animais foram mantidos em duplas, em gaiolas adaptadas, onde foram levemente suspensos pela cauda, com intuito de evitar que os membros posteriores tocassem o chão da gaiola (Figura 1). Este procedimento pretendeu evitar a ação da gravidade e promover atrofia do tecido muscular dos membros suspensos, simulando uma situação de inatividade física, tal qual ocorre em seres humanos.



Figura 1. Protocolo de inatividade física com os camundongos em duplas em gaiolas adaptadas e suspensos pela cauda. Animais com acesso irrestrito a dieta e água.

Este modelo foi criado inicialmente pela agência espacial americana e pretende simular os efeitos da falta da ação da gravidade no espaço (91). No entanto, diversas pesquisas foram realizadas com protocolos similares com outros propósitos, a fim de estudar as mudanças bioquímicas e fisiológicas também em condições de extrema inatividade física (92,93).

No modelo de IF do presente estudo, os camundongos foram suspensos por 12 h por dia, durante o ciclo noturno, quando o animal estaria naturalmente mais ativo. Este modelo pretendeu simular as condições reais de IF apresentada pelos seres humanos. Para viabilizar a pesquisa, foi realizado um revezamento dos pesquisadores para soltar ou suspender os animais durante o protocolo.

Os camundongos deste grupo tiveram acesso irrestrito à dieta e água e realizaram as demais atividades essenciais, podendo se movimentar com os membros anteriores. Neste caso, eles foram mantidos em gaiolas com até dois animais, proporcionando um contato mínimo para evitar qualquer dano ao sistema de suspensão e preservar o bem-estar mínimo do animal. Adicionalmente, os animais foram observados e pesados três vezes por semana. Nesse protocolo, os animais que apresentaram qualquer sinal persistente de estresse, como perda de peso (<2 DP da média), porfirina nos olhos ou comportamento anormal deveriam ser retirados do protocolo. Dois animais piloto foram necessários para treinamento e aprimoramento da técnica cirúrgica, neste caso.

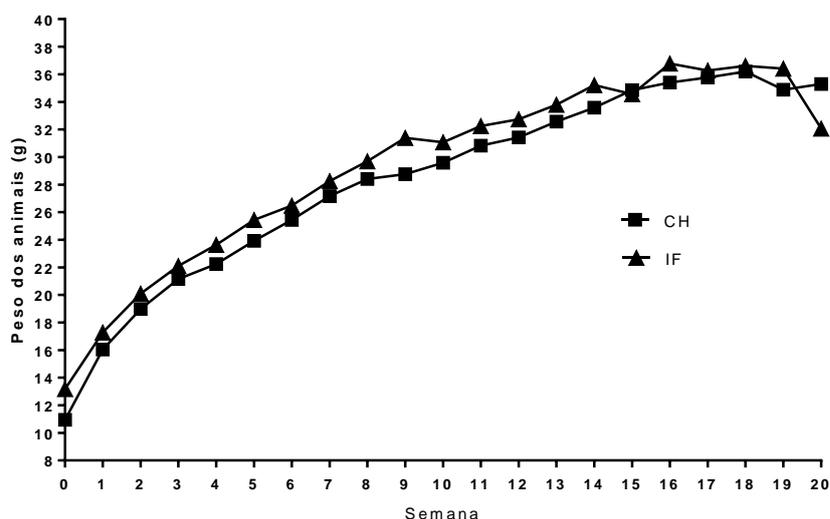
O modelo de elevação dos membros inferiores mais utilizado é o de elevação da cauda do animal através de tração cutânea, no qual aproximadamente dois terços da cauda do animal são envolvidos com fita adesiva conectada a um suporte giratório em formato de anzol, fixado em uma haste de metal na parte superior da gaiola. Contudo, em 2011, Ferreira e colaboradores publicaram um estudo descrevendo uma forma que eles consideravam mais eficiente de suspender a cauda do animal e evitar a incidência de possíveis complicações causadas pelo modelo de tração cutânea. O outro modelo, o qual também utilizamos no presente projeto, foi denominado de tração óssea. A modelo de tração óssea depende de uma única microcirurgia, na qual é implantado um anel entre a 6^a e 7^a vértebra da cauda do animal. Este foi fixado no suporte da haste metálica horizontal a gaiola, similar ao modelo anterior. Segundo Ferreira e colaboradores (2011), as vantagens deste novo método em comparação com o anterior são a observação constante da área da cauda pelo pesquisador responsável, evitando possíveis infecções e

problemas dermatológicos e os animais não tem nenhuma fita que possam tentar roer ou escapar (94).

1.2 ANÁLISE DO GRUPO INATIVIDADE FÍSICA

O grupo de animais obesos sob o protocolo de IF não foi considerado para a análise inferencial dos principais resultados obtidos no estudo, devido aos sinais de estresse apresentados pelos animais durante o protocolo de treinamento físico. Entretanto, foram realizadas análises comparativas dos pesos dos animais que justificam esta decisão.

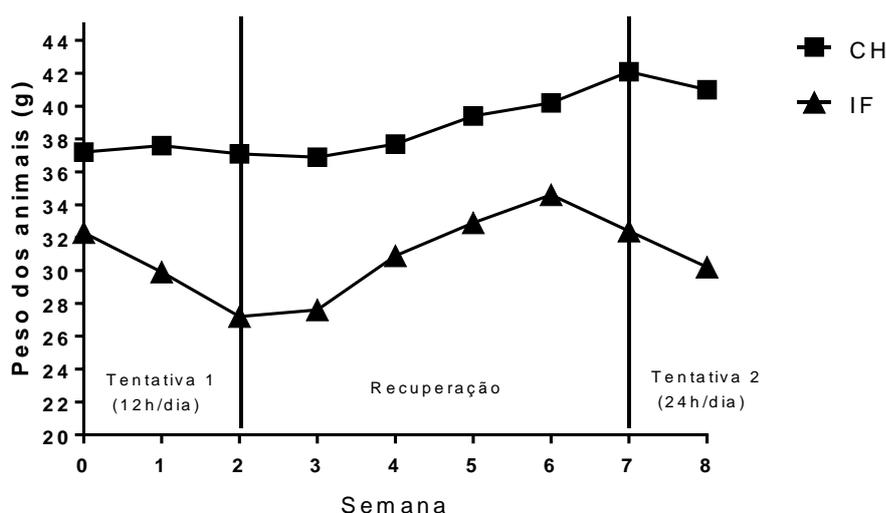
O peso do grupo IF foi comparado ao grupo controle-obesos (CH) para o período de 20 semanas de dieta, antes do início do protocolo de treinamento físico. Nesta fase, não houve diferença no consumo de água e dieta entre os grupos, assim como também não houve diferença no ganho de peso em relação ao grupo CH. Entre a semana 19-20, houve uma perda de peso significativa no grupo IF (-4,3 g), provavelmente devido a microcirurgia de implante de anel na cauda dos animais, já prevista para este protocolo. Nas semanas seguintes, os animais recuperaram adequadamente o peso e foram então incluídos no protocolo de treinamento físico. Dados de acordo com a Figura 2.



CH: Dieta Hiperlipídica/Sem intervenção IF: Dieta hiperlipídica/Inatividade Física

Figura 2. Valores semanais (em g) do peso do grupo de animais submetidos ao protocolo de inatividade física (IF) em comparação com o grupo controle-obesos (CH), antes do protocolo de intervenção.

Durante o protocolo de treinamento físico, houve a observação de intercorrências. A primeira tentativa de execução do protocolo de IF foi interrompida ao final da segunda semana do protocolo de treinamento físico, devido a significativa perda de peso (-5,1 g) e aos visíveis sinais de estresse apresentados pelos animais do grupo IF (Semana 0 a Semana 2). Após esta primeira tentativa, os anéis da cauda foram removidos e os animais foram mantidos em recuperação, sem intervenção, durante 5 semanas (Semana 2 a Semana 7). Após a completa recuperação dos animais deste grupo, foi realizada uma segunda tentativa. O método de suspensão dos animais foi modificado (24 h/dia) e foi realizado um método alternativo utilizando uma fita de esparadrapo ligada a um anel metálico para suspensão, durante uma semana (Semana 7 a Semana 8). No entanto, o segundo método também resultou em perda significativa de peso no grupo IF (-2,2 g), de acordo com a Figura 3.



CH: controle-obesos IF: Obesos/Inatividade Física

Figura 3. Valores semanais do peso dos animais do grupo submetido ao protocolo de inatividade física (IF) em comparação com o grupo controle-obesos (CH), durante o protocolo de treinamento físico.

Após o protocolo de treinamento físico, o peso dos animais foi significativamente menor (-10,8 g) no grupo IF em comparação ao grupo CH. Isso significa que, enquanto o grupo IF perdeu 6,2 g, o grupo CH ganhou 6,2 g durante o protocolo. Como se trata de um grupo que simulava a inatividade física em animais obesos, era esperado que os animais ganhassem peso de maneira similar ao grupo CH, o que não ocorreu.

Entre os sinais de estresse apresentados, o fator determinante para a descontinuação do protocolo de treinamento físico foi a acentuada perda de peso destes animais.

APÊNDICE B – ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA TOTAL PLASMÁTICA

As concentrações plasmáticas de testosterona apresentaram valores semelhantes entre todos os grupos. No entanto, esta variável não foi considerada para o estudo devido aos amplos erros padrões apresentados em todos os grupos, indicando uma inconsistência nos resultados. Dados apresentado de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Concentração plasmática de testosterona. Dados apresentados como média \pm EPM.

	CC	CH	MO	IN	ANOVA
Pré treinamento (ng/dl)	315,3 \pm 208,4	303,1 \pm 222,9	311,7 \pm 269,6	491,1 \pm 199,8	p=0,92
Pós treinamento (ng/dl)	551,5 \pm 529,3	1,2 \pm 0,3	491,7 \pm 469,3	3,4 \pm 0,9	p=0,68

CC: Controle CH: Controle-obesos MO: Obesos/Treinamento contínuo de intensidade moderada IN: Obesos/Treinamento intervalado de alta intensidade

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL

 <p>Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal</p>	<p>Brasília, 5 de maio de 2015.</p>
	
<p>DECLARAÇÃO</p>	
<p>Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO DOS EFEITOS DA INATIVIDADE FÍSICA E DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO FÍSICO EM MODELO ANIMAL DE HIPOGONADISMO ASSOCIADO À OBESIDADE", UnBDoC n.º 33236/2015, sob responsabilidade da Professora Adriana Lofrano Alves Porto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de <i>Mus musculus</i> - C57BL/6: 82. A presente aprovação é válida pelo período de 20/04/2015 a 20/07/2018.</p>	
 <p>Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior Coordenador da CEUA</p>	
<p>*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.</p>	